

**AKUTE PULMONALE EXAZERBATION BEI  
CYSTISCHER FIBROSE:  
VERÄNDERUNG NEUTROPHILER INFLAMMATIONSMARKER  
UNTER ANTIBIOTIKATHERAPIE**

**INAUGURAL-DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN  
DES FACHBEREICHES HUMANMEDIZIN  
DER JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIESSEN**

**VORGELEGT VON  
MATTHIAS ALEXANDER RÖSCHARD  
AUS VILLINGEN**

**GIESSEN 2005**

**AUS DEN FACHKLINIKEN WANGEN**

**KINDERKLINIK FÜR ATEMWEGSERKRANKUNGEN UND ALLERGIEN**

**LEITUNG: DR. MED. JOHANNES OTTO**

**AM VOGELHERD 4**

**88239 WANGEN**

**GUTACHTER: PD DR. ARTLICH**

**GUTACHTER: PROF. DR. LINDEMANN**

**TAG DER DISPUTATION: 19.10.2005**

**FÜR MEINE FRAU ROSWITHA UND UNSERE TOCHTER ANNA**

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Chronische Infektion der Atemwege bei CF.....	1
1.1.1. CFTR und mukoziliäre Clearance.....	2
1.1.2. Veränderte unspezifische Abwehr.....	3
1.1.3. Veränderte Adhäsionsmoleküle.....	3
1.1.4. Bakterielle Adaptation.....	4
1.1.5. Ineffektive Abwehr.....	4
1.2. Chronische Inflammation.....	5
1.2.1. Initiale Entzündungsreaktion.....	5
1.2.2. Perpetuierung der neutrophilen Entzündung.....	6
1.2.3. Gewebsschädigung durch neutrophile Granulozyten.....	7
1.3. Akute pulmonale Exazerbation.....	8
1.4. Marker neutrophiler Entzündungsaktivität.....	9
1.4.1. Humanes neutrophiles Lipocalin.....	10
1.4.2. Myeloperoxidase.....	11
1.4.3. Weitere Neutrophilenmarker.....	12
1.4.4. HNL als Neutrophilenmarker bei CF.....	12
1.5. Hypothese und Zielsetzung.....	13
1.5.1. Serum-HNL und akute pulmonale Exazerbation.....	13
1.5.2. Serum-HNL zum Therapiemonitoring.....	13
1.5.3. HNL und Krankheitsschweregrad.....	14
1.5.4. HNL als Marker der pulmonal lokalisierten Inflammation.....	14
2. Patienten, Material und Methoden.....	15
2.1. Patienten.....	15
2.2. Behandlung.....	17
2.3. Untersuchungen.....	18
2.4. Lungenfunktion, Krankheitsschweregrad.....	18
2.5. Aufbereitung der Sputumproben.....	19
2.6. Aufbereitung der Blutproben.....	20
2.7. Assays für HNL und MPO.....	20
2.8. Statistische Berechnungen.....	21
3. Ergebnisse.....	22
3.1. Vergleich der beiden Patientengruppen.....	22
3.2. Verlauf unter i.v.-Therapie.....	25
3.3. Korrelationen.....	30
4. Diskussion.....	33
4.1. Neutrophilenmarker im Serum.....	33
4.1.1. Diagnose einer akuten pulmonalen Exazerbation.....	33
4.1.2. Serum-Neutrophilenmarker unter i.v.-Therapie.....	36
4.1.3. Serum-Neutrophilenmarker und Krankheitsschweregrad.....	38

4.2. Neutrophilenmarker im Sputum.....	39
4.3. Schlussfolgerungen.....	41
5. Zusammenfassung.....	43
6. Literaturverzeichnis.....	47
7. Abkürzungsverzeichnis.....	59
8. Danksagung.....	60
9. Lebenslauf.....	61

# 1. Einleitung

Die Charakterisierung des für die cystische Fibrose (CF) verantwortlichen Gens [1, 2, 3] bedeutete 1989 einen entscheidenden Durchbruch in der Mukoviszidose-Forschung. Der Nachweis mutationsbedingter Veränderungen des „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR) war nicht nur die Grundlage für ein neues Verständnis der komplexen zellbiologischen Pathomechanismen der CF [4, 5]. Die Identifikation von zwischenzeitlich mehr als 1350 Mutationen im CFTR-Gen ermöglichte neue Einblicke in Evolution und Epidemiologie der Mukoviszidose [6] und war Voraussetzung für eine molekularbiologische Erweiterung der diagnostischen Möglichkeiten [7].

Dessen ungeachtet ist die Pathogenese der pulmonalen Erkrankung der CF mit vielen unbeantworteten Fragen behaftet und Gegenstand kontroverser Diskussion [8, 9, 10]. Die Entwicklung von einer histologisch weitgehend unauffällig erscheinenden Lunge bei Geburt [11] bis zur zerstörten Lunge des erwachsenen CF-Patienten ist durch ein vielschichtiges Krankheitsgeschehen gekennzeichnet, in dessen Mittelpunkt chronische Infektion und chronische Inflammation der Atemwege stehen [12].

## 1.1. Chronische Infektion der Atemwege bei CF

Obwohl bei der CF auch andere Organe vom primären Defekt des epithelialen Elektrolyttransports betroffen sind und Zeichen einer obstruierten kanalikulären Passage durch Sekret erhöhter Viskosität aufweisen können, wird eine persistierende Infektion und eine derart ausgeprägte begleitende Entzündungsreaktion nur in den Atemwegen angetroffen [8]. In der gesunden Lunge werden Bakterien, welche bei der Inspiration in kleiner Menge in die Atemwege gelangen, ohne signifikante

Entzündungsreaktion eliminiert. Die Frage, warum der Organismus von CF-Patienten nicht in der Lage ist, die Atemwege steril zu halten, konnte erst in neuerer Zeit besser beantwortet werden [12].

### **1.1.1. CFTR und mukoziliäre Clearance**

Der Basisdefekt bei der CF besteht in der fehlenden Aktivierbarkeit des CFTR durch cAMP. Dies führt zum Ausfall des Chloridionenflusses durch CFTR, welcher passiv entlang des jeweiligen Gradienten erfolgt. Gleichzeitig findet sich eine Regulationsstörung anderer Ionenkanäle, die von CFTR abhängig sind („outwardly rectifying chloride channel“ ORCC, dessen Funktion an die Gegenwart von intaktem CFTR gebunden ist, und „epithelial sodium channel“ ENaC, der in Gegenwart von CFTR down-reguliert wird) [8]. Am respiratorischen Epithel hat dies eine verminderte Chloridsekretion im Bereich des CFTR und des ORCC, sowie eine vermehrte Natriumresorption über den ENaC zur Folge [12, 13]. Neuere Untersuchungen sprechen dafür, dass dabei die Osmolarität und die Zusammensetzung der Elektrolyte im Flüssigkeitsfilm des Atemwegsepithels nicht verändert ist, dass jedoch das Volumen des epithelialen Flüssigkeitsfilms reduziert wird [14 – 19]. Diese Beobachtungen wurden als „isotonic, low-volume-Hypothese“ zusammengefasst, und es wurde postuliert, dass die Verminderung der periziliären Flüssigkeitstiefe zu einer primären Beeinträchtigung der mukoziliären Clearance bei CF-Patienten führt. Dieses letzte Bindeglied in der logischen Kette vom Basisdefekt der CF zur chronischen Infektion ist aber bisher nicht bewiesen [12].

Die Fehlfunktion von CFTR wird auch mit der Sekretion eines vermindert hydrierten, und somit vermehrt viskösen Schleims aus submukösen Drüsen in Verbindung gebracht [20]. Eine primäre, der Atemwegsinfektion vorausgehende Störung der mukoziliären Clearance durch erhöhte Schleimviskosität ist aber ebenfalls nicht belegt [12].



### 1.1.2. Veränderte unspezifische Abwehr

Die Elimination kleinerer Mengen von inhalierten Bakterien ohne aufwändige Mobilisierung zellulärer und immunologisch komplexerer Abwehrmechanismen ist die Aufgabe des Systems der nicht-adaptiven Immunabwehr. Zu diesem Netzwerk möglicher antimikrobieller Substanzen der Atemwegsflüssigkeit zählen etwa Lysozym, Defensine und Stickstoffmonoxid (NO), deren Bedeutung für die Pathogenese der chronischen Atemwegsinfektion bei CF größtenteils unbekannt oder umstritten ist [12]. Beachtung fand in letzter Zeit vor allem NO, welches neben vasomotorischen auch proinflammatorische und antimikrobielle Eigenschaften hat [21]. Die Konzentration von NO ist in der Ausatemluft von CF-Patienten vermindert [22], und die Expression der induzierbaren NO-Synthase war im CF-Modell der Maus sowie in Zellkultur abhängig von intaktem CFTR [23].

### 1.1.3. Veränderte Adhäsionsmoleküle

Klassischerweise wird für eine Infektion durch bakterielle Erreger eine vorangehende Adhäsion an Zellen des Organismus vorausgesetzt. Dieses Paradigma ist wahrscheinlich auch für die CF im frühen Krankheitsstadium gültig [12]. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae* können über Asialo-GM1 an Epithelzellen der Atemwege binden. Asialo-GM1 ist bei CF auf der Oberfläche des Atemwegsepithels vermehrt, was zu einer Verdopplung der Adhäsionsrate dieser Bakterien führen kann [24, 25]. Die Bindung von Asialo-GM1 an seinen bakteriellen Liganden Pilin aktiviert außerdem den nukleären Transkriptionsfaktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) [26] und induziert damit die Bildung von Interleukin 8 (IL-8) [27], was möglicherweise den Beginn der neutrophil dominierten Entzündung bedeutet.

#### **1.1.4. Bakterielle Adaptation**

Während *H. influenzae* und *S. aureus* den chronischen Infektionsprozess der ersten Krankheitsjahre dominieren, sind mit drei Jahren über 30 % und im jungen Erwachsenenalter 80 % der CF-Patienten mit *P. aeruginosa* infiziert [12]. *P. aeruginosa* verfügt dabei über außerordentlich wirksame und flexible Adaptationsmechanismen. Diese ermöglichen ihm Resistenz gegenüber antibiotischer Behandlung [28], Umgehung der humoralen und zellulären Abwehr [29] sowie Persistenz durch seine räumliche Organisation in einem Biofilm [30, 31].

#### **1.1.5. Ineffektive Abwehr**

Erregerpersistenz und somit chronische Infektion bedeuten eine anhaltende Aktivierung und Rekrutierung inflammatorischer Zellen durch bakterielle Stimuli. Chronische Infektion und chronische Inflammation sind im späteren Krankheitsstadium untrennbar miteinander verknüpft. Zu diesem Zeitpunkt ist der Abwehrprozess durch zwei Eigenschaften gekennzeichnet: Er ist überschießend, exzessiv, und er ist in hohem Maße ineffektiv [12]. Eine Erregerelimination durch zelluläre Abwehrmechanismen ist nicht mehr möglich. Vielmehr wird die Erregerabwehr wie in einem Circulus vitiosus durch ihre eigenen Zellprodukte (z. B. neutrophile Elastase) beeinträchtigt [32]. Schließlich führen Infektion und Inflammation zu einer sekundären Beeinträchtigung der mukoziliären Clearance [33] und zur Retention von Bakterien in atelektatischen Bezirken und Bronchiektasen.

## **1.2. Chronische Inflammation**

Mit den Untersuchungen von Khan et al. [9] und Balough et al. [34] kam Mitte der 90er Jahre die Frage auf, ob bei Säuglingen mit CF eine signifikante Entzündungsreaktion in den Atemwegen jeglicher mikrobieller Besiedelung oder Infektion vorausgehen kann. Es wurde postuliert, dass eine primäre und frühe Inflammation durch ihre Gewebsschädigung selbst zum Wegbereiter der ersten Keimbesiedelung bei CF-Patienten werden kann [9]. Die klassische Sequenz von Infektion und Inflammation wurde somit umgekehrt in der Annahme, dass der Basisdefekt des CFTR auf nicht bekanntem Weg möglicherweise schon früh eine Inflammationsreaktion initiiert oder verstärkt [35]. Obwohl diese Überlegungen durch die methodisch wenig anfechtbaren Ergebnisse von Armstrong et al. entkräftet wurden, zeigen diese Untersuchungen doch, dass die Kaskade von Infektion und Inflammation unter Umständen schon in den ersten Lebensmonaten und unabhängig von einer klinischen Symptomatik ihren Lauf nimmt [10]. Wie im späteren Verlauf ist auch diese frühe Entzündungsreaktion bei CF durch das Auftreten von neutrophiler Infiltration, erhöhter IL-8-Konzentration und freier Neutrophilen-Elastase-Aktivität in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) gekennzeichnet [9, 10].

### **1.2.1. Initiale Entzündungsreaktion**

Zu Beginn der pulmonalen Infektion findet die Auseinandersetzung zwischen Bakterien und menschlichem Wirt im Bereich der Atemwegsepithelien und der Makrophagen statt. Beide Zellpopulationen werden durch den Kontakt mit verschiedenen bakteriellen Produkten aktiviert und reagieren mit der Freisetzung unterschiedlicher Zytokine [12]. Im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe waren die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6 und IL-8 in der BAL-Flüssigkeit erhöht [36]. Diese Zytokine stehen am Anfang einer komplexen

Inflammationskaskade, in welcher dem IL-8 als Chemokin der Neutrophilen besondere Bedeutung zukommt. Beim Versuch einer Quantifizierung der neutrophilen Entzündungsreaktion im Verhältnis zur Bakterienlast in der BAL-Flüssigkeit ergab sich kein Unterschied zwischen Pseudomonas-positiven und Pseudomonas-negativen CF-Patienten in frühem Krankheitsstadium. Jedoch war das Ausmaß der Inflammationsreaktion im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von Patienten mit anderen respiratorischen Problemen deutlich erhöht [37]. Die neutrophil dominierte Entzündung bei CF erscheint somit schon zu Beginn überschießend oder verlängert. Eine mangelnde Kontrolle der neutrophilen Inflammation steht möglicherweise in Zusammenhang mit einer down-Regulation der IL-10-Bildung in Bronchialepithelzellen (IL-10 leitet die Apoptose von Neutrophilen ein.) [12, 36, 38].

### **1.2.2. Perpetuierung der neutrophilen Entzündung**

Charakteristisch für die CF ist, dass das anfängliche zelluläre Muster der „akuten“ (neutrophilen) Entzündung im Krankheitsverlauf nie zu einem mehr „chronischen“ konvertiert [12]. Neutrophile Granulozyten dominieren sowohl die initiale als auch die chronisch fortgeschrittene bronchiale Inflammation. Die dafür möglichen Ursachen sind vielschichtig. Eine endobronchiale Anhäufung neutrophiler Granulozyten kann einerseits aus einer anhaltenden Rekrutierung und zum anderen auch aus einer verlängerten Überlebensdauer dieser Zellen resultieren.

Bakterielle Adaptationsmechanismen wie mukoider Phänotyp, Organisation in einem Biofilm und Antibiotikaresistenz [28, 29, 30, 31] führen zu einer Persistenz bakterieller Signale für die Migration der Neutrophilen. Die Ineffektivität zellulärer Abwehrmechanismen, wie sie etwa durch die Anwesenheit freier neutrophiler Elastase bedingt ist [32], trägt zur Erregerpersistenz bei. Möglicherweise spielen aber auch nicht bakteriell ausgelöste Stimuli bei der Perpetuierung der Entzündungsreaktion eine Rolle. So konnte beispielsweise eine Induktion von IL-8 in bronchialen Epithelzellen bei

Anwesenheit von freier neutrophiler Elastase nachgewiesen werden [39]. Des weiteren wurde die bei CF bekannte Immunkomplexbildung als Ausgangspunkt einer vermehrten Bildung proinflammatorischer Zytokine angesehen [40].

Eine verlängerte Überlebensdauer neutrophiler Granulozyten steht möglicherweise im Zusammenhang mit einem Ausbleiben der Apoptose dieser Zellen unter den Bedingungen der Lunge von CF-Patienten. Als Ursachen hierfür wurden eine verminderte IL-10-Produktion bronchialer Epithelzellen [12, 36, 38] sowie das Vorliegen einer Gewebshypoxie diskutiert [41].

### **1.2.3. Gewebsschädigung durch neutrophile Granulozyten**

Obwohl die Konversion zu einem mukoiden Phänotyp typischerweise mit einer Verminderung der Virulenz von *P. aeruginosa* assoziiert ist [42], scheint das Auftreten mukoider Stämme mit einem beschleunigten Verlust an Lungenfunktion bei CF-Patienten verbunden zu sein [43]. Dies wurde als Hinweis dafür gewertet, dass eine Schädigung der Lunge mit progredientem Funktionsverlust weniger durch bakterielle Exotoxine, als vielmehr durch die anhaltende und hochgradig ineffektive Entzündungsreaktion des Organismus bedingt ist [12]. Gewebsschädigende Effekte wurden vor allem den bei CF dominierenden neutrophilen Granulozyten zugeschrieben [44]. Neutrophile enthalten eine Vielzahl potentiell toxischer Zellprodukte, deren destruktive Wirkung durch komplexe Schutzmechanismen wie Inhibition und Kompartimentierung kontrolliert wird. Die Umgehung dieser Kontrollmechanismen unter bestimmten Voraussetzungen, wie sie auch im Milieu der Atemwege bei CF gegeben sind, ist die Grundlage für einen progredienten Umbau der Lunge. Im Mittelpunkt steht dabei einerseits die Aktivierung neutrophiler Zellen mit Bildung von Wasserstoffperoxyd (durch NADPH-Oxidase) und Hypochlorsäure (durch Myeloperoxidase), sowie andererseits der nicht-apoptotische Zerfall der Neutrophilen mit Freisetzung proteolytischer Enzyme wie z. B. Elastase, Metalloproteinasen und Cathepsin G. Erst das Zusammentreffen von Oxidantien und Proteasen führt in vivo zur

vollen Entfaltung der gewebserstörerischen Wirkung der neutrophilen Inflamationsreaktion, indem Antiproteasen oxidativ inaktiviert und Metalloproteinasen oxidativ aktiviert werden (Übersichten bei [44] und [45]).

Der Zerfall neutrophiler Granulozyten als Endstrecke im Wechselspiel von Infektion und Inflammation wird im übrigen auch für die sekundäre Störung der mukoziliären Clearance bei CF verantwortlich gemacht. So führt die Freisetzung von DNA aus dem Zellkern sowie von Aktinfilamenten aus dem Zytoskelett zu einer Vernetzung des Mukus und in der Folge zu einer erhöhten Viskoelastizität [33].

### **1.3. Akute pulmonale Exazerbation**

Nach Aussage der *Cystic Fibrosis Foundation* wurde unter einer akuten pulmonalen Exazerbation in den vergangenen Jahren gewöhnlich eine akute Veränderung pulmonaler Symptome im Sinne einer vermehrten Sekretproduktion verstanden. Trotz der zentralen Bedeutung akuter Exazerbationen in der neueren klinischen Forschung gibt es bislang keinen Konsens für eine allgemeine Definition [46]. Dies macht vor allem den Vergleich von Studienergebnissen schwierig. Problematisch sind ferner unterschiedliche ätiologische Auffassungen des Begriffs akuter pulmonaler Exazerbationen. So wurde postuliert, dass eine Reihe von Ereignissen (einschließlich viraler und bakterieller Infektionen sowie Exposition gegenüber Reizstoffen und Allergenen) zur Störung einer quasi stabilen Homöostase in der Lunge von CF-Patienten führen kann [47]. Dabei bliebe die ursächliche Rolle der endobronchialen Keimdicke und die mögliche Kontrolle [48] oder Prophylaxe [49] akuter pulmonaler Exazerbationen durch Reduktion der Keimzahl mittels antibiotischer Therapie zu wenig berücksichtigt. Der Begriff der akuten pulmonalen Exazerbation bezieht sich im engeren Sinne auf eine Entgleisung der chronisch infektiösen und inflammatorischen Prozesse durch eine erdrückende Proliferation von *P. aeruginosa* oder anderer bakterieller Erreger. Gleichzeitig finden sich meist systemische Zeichen der

Entzündungsreaktion. Für den Gebrauch in klinischen Studien wurde die standardisierte Erhebung von einfach erkennbaren Symptomen, klinischen Untersuchungsbefunden und von Veränderungen der Lungenfunktion empfohlen [50]. Die klinische Abgrenzung der bakteriell bedingten akuten Exazerbation von einer (antibiotisch) primär nicht therapiebedürftigen Virusinfektion bleibt dennoch problematisch. Für die vorliegende Studie waren entscheidende Faktoren in diesem Zusammenhang Persistenz der Beschwerden sowie Resistenz gegenüber nicht-antibiotischer Therapie.

## **1.4. Marker neutrophiler Entzündungsaktivität**

Die Beurteilung der Aktivität entzündlicher Erkrankungen ist im klinischen Alltag unerlässlich für die sich hieraus ergebenden therapeutischen Entscheidungen. Dabei wird die Erhebung von Symptomen und klinischem Befund gewöhnlich durch die Bestimmung von einfachen hämatologischen Parametern, Blutkörperchen-Senkungsgeschwindigkeit und Akut-Phase-Proteinen ergänzt. Diese konventionellen Entzündungsparameter sind aber nicht bei allen entzündlichen Erkrankungen hilfreich (wie etwa bei allergischen oder viralen Krankheiten), spiegeln immer nur den Anteil systemischer Entzündungsaktivität wieder und sind somit für die Beurteilung einer eher lokal begrenzten Inflammationsreaktion nicht zu gebrauchen. Sie sind ferner oft mit einer eingeschränkten Sensitivität und Spezifität behaftet und ermöglichen durch ihre Unspezifität keinen Einblick in die Pathophysiologie entzündlicher Erkrankungen [51]. Um diese Nachteile zu überwinden, wurden in den letzten Jahren neuere laborchemische Methoden zur Untersuchung der Entzündungsaktivität entwickelt. Der Stellenwert von Zytokinbestimmungen im klinischen Alltag ist derzeit noch schwer zu beurteilen. Zytokine als Botenstoffe der Entzündung sind nicht spezifisch für einen bestimmten Zelltyp oder eine bestimmte Inflammationsreaktion. Sie sind durch Pleiotropie (ein Zytokin hat mehrere verschiedene Wirkungen) und Redundanz (eine bestimmte Wirkung wird durch unterschiedliche Zytokine vermittelt) gekennzeichnet.

Zytokine werden nur temporär gebildet und haben in vivo eine extrem kurze Halbwertszeit, was ihre diagnostische Aussagekraft erheblich einschränkt [52]. Empfindlichere und mehr spezifische Methoden beruhen auf einem Konzept von „eine Zelle – ein Marker“ oder besser „eine Zellfunktion – ein Marker“. Vor allem das eosinophile kationische Protein (ECP) fand Eingang in die klinische Anwendung bei der Untersuchung eosinophil dominierter Entzündungsprozesse wie etwa dem Asthma bronchiale. Noch wenig etabliert sind hochspezifische Marker neutrophiler Entzündungsaktivität (Übersicht bei [51]). Solche Neutrophilenmarker sind für die CF als neutrophil dominierte inflammatorische Erkrankung besonders interessant.

#### **1.4.1. Humanes neutrophiles Lipocalin**

Humanes neutrophiles Lipocalin (HNL) ist ein 25-kDa Glycoprotein, welches zwischen 1989 und 1994 durch vier voneinander unabhängige Gruppen entdeckt wurde [53 – 56]. Synonym finden sich in der Literatur deshalb die Begriffe N-Formyl peptide binding protein, 25-kDa  $\alpha$ 2-microglobulin-related protein und neutrophil gelatinase associated lipocalin [57]. HNL gehört zur Familie der Lipocaline, welche als Glycoproteine mit weit zurück reichendem Ursprung bei einer Vielfalt von Spezies von den Arthropoden bis zu den Säugetieren anzutreffen sind. Lipocaline verfügen über eine gemeinsame Tertiärstruktur, die ihnen den Transport kleiner lipophiler Substanzen ermöglicht [58]. HNL findet sich in leicht mobilisierbaren Peroxidase-negativen (sekundären, spezifischen) Granula der Neutrophilen, gemeinsam mit Lactoferrin und nur teilweise assoziiert mit Gelatinase [58]. Als mögliche Funktion in entzündlichen Prozessen wird HNL eine bakteriostatische Wirkung durch enge Bindung bakterieller Siderophoren zugeschrieben. Wie Lactoferrin, welches freies Eisen bindet, stört HNL damit die bakterielle Eisenaufnahme und trägt so als Teil des nicht-adaptiven Immunsystems zur antibakteriellen Strategie einer Eisenverarmung bei [59].

Im peripheren Blut sowie in Sputum und bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit konnte HNL ausschließlich in neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden und gilt



deshalb als spezifisch für diesen Zelltyp [60, 61]. Eine Expression in weiteren Geweben unter verschiedenen Bedingungen wird aber diskutiert [59, 62]. HNL wurde in den letzten Jahren als idealer Neutrophilenmarker angesehen [51]. Zugrunde liegt die Vorstellung, dass HNL bei einer Aktivierung des Neutrophilen durch Exozytose der sekundären Granula besonders leicht ins extrazelluläre Milieu freigesetzt wird. Seine Konzentration in Serum und anderen Körperflüssigkeiten hängt einerseits von der Anzahl beteiligter neutrophiler Granulozyten und zum andern vom Grad ihrer Aktivierung ab. Der HNL-Spiegel im untersuchten Milieu wird deshalb als Maß für die Intensität einer neutrophilen Entzündung betrachtet [51]. Für die Bestimmung von HNL in Körperflüssigkeiten wurden verschiedene Immunoassays entwickelt [63, 64, 65]. Die Untersuchung von HNL ermöglichte Einblicke in die Pathophysiologie bei einer Reihe von Erkrankungen. So wurde auf eine neutrophile Beteiligung u. a. bei rheumatoider Arthritis, entzündlichen Darmerkrankungen oder chronisch obstruktiver Lungenerkrankung geschlossen [57]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass HNL im Serum von Patienten mit akuter bakterieller Infektion erhöht ist, und dass die Bestimmung von HNL im Serum für die Unterscheidung bakterieller und viraler Infektionen herangezogen werden kann. HNL erzielte dabei eine höhere Sensitivität und Spezifität als C reaktives Protein (CRP) [66].

#### **1.4.2. Myeloperoxidase**

Myeloperoxidase (MPO) konnte erstmals 1941 von Agner aus purulenter Flüssigkeit isoliert werden. Ihre grüne Farbe ist für den charakteristischen grünen Schimmer eitrigere Flüssigkeiten verantwortlich und sie wurde deshalb zunächst Verdoperoxidase genannt [44]. MPO katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxyd mit Chloridionen oder anderen Halogenanionen zu deren hypohalogenen Säuren (vor allem Hypochlorsäure, welche im Rahmen neutrophiler Entzündungsprozesse für die Zerstörung des Antiproteasen-Schutzschildes im umliegenden Gewebe verantwortlich gemacht wird) [44].

Im Gegensatz zu HNL wird MPO in einer anderen Subpopulation von Neutrophilen-Granula, den primären (peroxidase-positiven, azurophilen) Granula gespeichert. Primäre Granula gehören zu den Lysosomen und enthalten eine Reihe saurer Hydrolasen, zu denen z. B. auch die Neutrophilen-Elastase gehört. Durch Entzündungsmediatoren werden primäre Granula kaum mobilisiert. Sie sind vor allem für eine Fusion mit phagozytären Vakuolen bestimmt oder ihr Inhalt wird ins extrazelluläre Milieu freigesetzt, wenn der neutrophile Granulozyt zerfällt [58].

Neben den Neutrophilen findet sich MPO auch in Makrophagen und Monozyten. Herkunft und Funktion der MPO lassen somit deutliche Unterschiede zu HNL erkennen: Geringere Zellspezifität, geringere Mobilisierbarkeit bei Aktivierung des Neutrophilen sowie hauptsächliche Freisetzung bei Neutrophilenzerfall. Die Bestimmung der MPO in Serum und anderen Körperflüssigkeiten zur Messung neutrophiler Entzündungsreaktionen vermittelt somit zumindest teilweise andere Informationen als die Untersuchung von HNL [51].

### **1.4.3. Weitere Neutrophilenmarker**

Neutrophile Granulozyten enthalten weitere Zellprodukte, welche als Neutrophilenmarker in Frage kommen. Immunoassays wurden für Elastase (aus primären Granula) sowie Lactoferrin und Lysozym (aus sekundären Granula) entwickelt, wobei deren Zellspezifität geringer ist als die von HNL [51].

### **1.4.4. HNL als Neutrophilenmarker bei CF**

In einer Studie von Eichler et al. [67] wurde HNL erstmals bei CF-Patienten als systemischer Inflammationsmarker evaluiert. Die Autoren untersuchten 42 Patienten mit CF und 25 gesunde Individuen. Die mediane Konzentration von HNL, MPO und Lactoferrin im Serum war bei CF-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant

erhöht. CF-Patienten mit chronischer Pseudomonasinfektion hatten höhere HNL-, MPO-, und Lactoferrin-Werte als Pseudomonas-negative. Bei Patienten mit akuter pulmonaler Exazerbation waren die Serum-Spiegel von HNL, MPO und Lactoferrin signifikant höher als bei stabilen Patienten im Intervall. Zur Differenzierung akuter pulmonaler Exazerbationen schien HNL den anderen Neutrophilenmarkern und dem CRP überlegen zu sein. Außerdem war HNL in geringem Maß mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert.

## **1.5. Hypothese und Zielsetzung**

### **1.5.1. Serum-HNL und akute pulmonale Exazerbation**

HNL im Serum erwies sich als sensitiver und spezifischer Marker für die Diagnose einer akuten pulmonalen Exazerbation bei CF-Patienten mit chronischer Pseudomonasinfektion [67]. Dieses Ergebnis der Studie von Eichler et al. sollte mit der vorliegenden Arbeit zunächst bestätigt werden. Ähnlich wie in der genannten Arbeit, sollte die MPO im Serum dabei als Vergleichsparameter dienen.

### **1.5.2. Serum-HNL zum Therapiemonitoring**

Die Reversibilität einer HNL-Erhöhung im Serum in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität wurde bisher nicht untersucht. Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass die im Serum mit Hilfe von HNL und MPO gemessene neutrophile Entzündungsaktivität bei akuter pulmonaler Exazerbation unter einer intravenösen antibiotischen Behandlung rückläufig ist. Die Werte nach der Behandlung sollten den Serumwerten von einer Gruppe stabiler Patienten vergleichbar sein. Ziel war gleichzeitig die Evaluation von HNL im Serum als Parameter zum Therapiemonitoring. Hierzu sollte insbesondere ein frühes Ansprechen unter der Behandlung gezeigt werden.

### **1.5.3. HNL und Krankheitsschweregrad**

Neben der gefundenen Erhöhung bei aktuell vermehrter Krankheitsaktivität war das Serum-HNL in der Arbeit von Eichler et al. [67] auch in geringem Maße mit dem Krankheitsschweregrad korreliert. Bei der dabei durchgeführten Querschnittserhebung unter Einbeziehung gleichzeitig exazerbierter Patienten erscheint das Ergebnis diesbezüglich eingeschränkt. In der vorliegenden Studie sollten deshalb nur stabile Patienten in die Errechnung der Korrelation zum Schweregrad eingehen.

### **1.5.4. HNL als Marker der pulmonal lokalisierten Inflammation**

Es wird davon ausgegangen, dass die im Serum zirkulierenden Zellmarker aus den im peripheren Blut zirkulierenden, aktivierten Entzündungszellen stammen [51]. Der Spiegel von HNL im Serum bei CF-Patienten mit akuter Exazerbation wäre somit lediglich ein Maß für die systemische Entzündungsaktivität. Anhand der vorliegenden Studie sollte gezeigt werden, dass systemische und pulmonal lokalisierte Entzündung miteinander korrelieren und dass sich die Werte von HNL in Serum und Sputum bei pulmonaler Exazerbation sowie unter einer antibiotischen Behandlung weitgehend konform verhalten.

## 2. Patienten, Material und Methoden

### 2.1. Patienten

Im Rahmen einer kooperativen Studie der Fachkliniken Wangen und der Universitätskinderklinik Wien wurden insgesamt 27 CF-Patienten aus den beiden pädiatrischen Einrichtungen untersucht. Fünfzehn der teilnehmenden Patienten waren weiblich und 12 männlich, das mittlere Alter ( $\pm$  Standardabweichung) betrug  $13.2 \pm 3.79$  Jahre, das mittlere Einsekundenvolumen (FEV1) lag bei  $73.4 \pm 25.4$  % pred. Die Diagnose war jeweils gesichert durch einen wiederholt pathologisch ausfallenden

*Tabelle 1:* Keimspektrum der Sputumkulturen bei 27 untersuchten CF-Patienten mit chronischer pulmonaler Infektion

	<b>chronische Infektion</b>	<b>sporadischer Nachweis</b>	<b>Gesamt</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21 Patienten	3 Patienten	24 Patienten
<i>Staphylococcus aureus</i>	19 Patienten	1 Patient	20 Patienten
<i>Haemophilus influenzae</i>	3 Patienten	3 Patienten	6 Patienten
<i>Burkholderia cepacia</i>	1 Patient	1 Patient	2 Patienten

(eine einzelne Keimspezies lag bei sechs Patienten vor, zwei verschiedene Spezies bei 16 Patienten und drei Spezies bei fünf Patienten)

Schweißtest [68] (Chlorid im Schweiß über 60 mmol/l) in Verbindung mit einem für die CF typischen klinischen Bild. Alle Patienten hatten eine pulmonale Verlaufsform mit chronischer Infektion durch einen oder mehrere Stämme von *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *S. aureus* oder *Burkholderia cepacia* (Tab. 1). Eine chronische pulmonale

Infektion wurde dabei definiert als anhaltender Nachweis gleicher Keime in der Sputumkultur über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten bei gleichzeitig bestehender charakteristischer Symptomatik (Produktion von purulentem Sputum) sowie wiederholter Notwendigkeit einer antibiotischen Behandlung.

Von der Studie ausgeschlossen wurden Patienten unter sechs Jahren (wegen zu erwartender Probleme bei der Lungenfunktionsprüfung und beim Sammeln von Sputumproben). Ebenfalls ausgeschlossen wurden Patienten mit nachgewiesener allergisch-bronchopulmonaler Aspergillose und solche, die in den letzten vier Wochen vor Aufnahme mit systemisch verabreichten Steroiden behandelt wurden.

Die Patienten wurden prospektiv in zwei Gruppen eingeteilt, eine mit und eine ohne akute pulmonale Exazerbation. Letztere war dabei durch das Vorliegen von mindestens zwei der folgenden klinischen Zeichen definiert: Zunahme von Husten, vermehrte Sputumproduktion, zunehmende Kurzatmigkeit, verminderte körperliche Belastbarkeit, Gewichtsverlust über 0.5 kg, ausgeprägtere Appetitlosigkeit, Fieber über 38 °C. Mindestens eines der genannten respiratorischen Symptome war dabei obligat. Zur klinischen Unterscheidung von passageren Virusinfekten sollten die Beschwerden zuvor seit mehr als einer Woche fortbestanden haben und gegenüber einer konventionellen Behandlung mit Physiotherapie und Inhalationen sowie gegebenenfalls gegenüber einer oralen Staphylokokken-wirksamen Antibiotikatherapie resistent gewesen sein. Zusätzliche Kriterien der pulmonalen Exazerbation waren Verschlechterung der transkutan gemessenen Sauerstoffsättigung oder der Lungenfunktionswerte sowie neu aufgetretene Infiltrate im Thorax-Röntgenbild. In der ersten Gruppe (mit pulmonaler Exazerbation) wurden 19 Verläufe bei 17 Patienten untersucht. Davon waren 9 männlich und 8 weiblich, das Alter betrug im Mittel ( $\pm$  Standardabweichung)  $13.6 \pm 3.97$  Jahre. Zur zweiten Gruppe (Kontrollgruppe) gehörten 10 Patienten, welche sich in stabiler Verfassung befanden. Davon waren 7 weiblich und 3 männlich, sie waren im Mittel  $12.5 \pm 3.35$  Jahre alt.

Alle diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen wurden im Rahmen der klinischen Routine durchgeführt, so dass keine zusätzlichen Untersuchungen oder Blutentnahmen notwendig waren. Die Patienten bzw. ihre Eltern wurden über die

Studie und deren Zielsetzung aufgeklärt. Bei einer Teilnahme gaben sie ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung der gewonnenen Untersuchungsmaterialien und Daten.

## 2.2. Behandlung

Die individuelle Dauertherapie mit Substitution von Enzymen und Vitaminen, Inhalation von Bronchodilatoren, Tobramycin, topischen Steroiden oder DNase, sowie die bei 2 Patienten bestehende Sauerstoffbehandlung wurden unverändert fortgesetzt. Eine orale Langzeittherapie mit Staphylokokken-wirksamen Antibiotika wurde pausiert, wenn eine intravenöse antibiotische Behandlung begonnen wurde. Zur Physiotherapie führten die Patienten einmal täglich die autogene Drainage durch und während der Inhalationen verwendeten sie dreimal täglich einen Flutter des Typs VRP1 Desitin®.

In der Gruppe mit pulmonaler Exazerbation wurden die Patienten über 14 Tage (in einem Fall 18 Tage) intravenös mit einer Kombination aus Cefotaxim (160 – 200 mg/kg Körpergewicht) oder Meropenem (70 – 100 mg/kg) mit Tobramycin (10 mg/kg) behandelt. In Fällen mit Nachweis von *Staphylococcus aureus* wurde die Behandlung teilweise durch eine intravenöse Gabe von Flucloxacillin (150 mg/kg) ergänzt.

Auch in der Kontrollgruppe stabiler Patienten erhielten drei eine Pseudomonas-wirksame i.v.-Therapie als elektive Behandlung, wie sie vom Kopenhagener CF-Zentrum eingeführt wurde [49].

## 2.3. Untersuchungen

Bei allen Patienten (29 Fälle) wurden zu Beginn (Tag 0) ein klinischer Status erhoben und laborchemische Entzündungsparameter bestimmt. Im Fall einer intravenösen antibiotischen Behandlung wurden die Untersuchungen an Tag 4 oder 5 (bei der Blutabnahme zur Bestimmung des Tobramycin-Spiegels) und am Ende der i.v.-Therapie wiederholt. Solche Kontrolluntersuchungen zum Therapiemonitoring konnten in 16 von 19 Fällen mit akuter pulmonaler Exazerbation und bei der Kontrollgruppe in den drei Fällen mit elektiver i.v.-Therapie gewonnen werden.

## 2.4. Lungenfunktion, Krankheitsschweregrad

Lungenfunktionsuntersuchungen wurden mit einem Pneumotachograph (Masterlab, Jaeger, Deutschland) durchgeführt. Die Werte für das FEV1 und für den maximalen expiratorischen Atemfluss bei 50 % der Atemphase (MEF50) wurden nach den Richtlinien der American Thoracic Society [69] in Form einer Fluss-Volumen-Kurve aufgezeichnet. Für die Berechnungen wurde der beste von drei Versuchen ausgewählt. Die Ergebnisse der Lungenfunktionsuntersuchungen erscheinen in Prozent des Vorhersagewertes, basierend auf allgemein verwendeten Referenzwerten von Zapletal et al. [70]. Der Krankheitsschweregrad wurde bei einem Teil der Patienten mit Lungenfunktionsparametern (der forcierten Vitalkapazität FVC und dem Quotienten FEV1/FVC) sowie mit Hilfe eines modifizierten Shwachman-Kulczycki-Score [71] eingeschätzt. Unter Ausschluss der bei nicht allen Patienten verfügbaren radiologischen Befunde lag hier das Maximum der erreichbaren Punkte bei 75 (Tab. 2).



Tabelle 2: Parameter des Krankheitsschweregrades, Patientenkollektiv aus Wangen

	<b>Gesamtgruppe (n = 17)</b>	<b>exazerbierte Patienten (n = 7)</b>	<b>stabile Patienten (n = 10)</b>
modifizierter Shwach- man- Score	47.6 ± 12.5	37.1 ± 7.5	55 ± 9.7
FVC [% des Sollwertes]	91.5 ± 18.9	89.6 ± 22.5	92.8 ± 15.8
FEV1/FVC	0.77 ± 0.1	0.72 ± 0.1	0.81 ± 0.07

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Die Werte der Lungenfunktion wurden in der Gruppe exazerbierter Patienten nach Abschluss der i.v.-Antibiotikatherapie bestimmt.

## 2.5. Aufbereitung der Sputumproben

Die Aufbereitung der Sputumproben erfolgte wie früher beschrieben [72]: Während der Durchführung der Atemtherapie wurden Sputumproben in sterilen Kunststoffbehältern aufgefangen. Nach dem Abwiegen wurde ein Milliliter Phosphatpuffer (PBS, pH 7.4, Gibco Life Technologies) pro Gramm Sputum hinzugefügt. Sputum und Puffer wurden bis zum Erhalt eines homogenen Gemischs mit dem Vortex vermengt und die Proben umgehend über 30 Minuten bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Entnahme des Überstandes wurde dieser bis zur Messung der Neutrophilenparameter HNL und MPO bei -20 °C eingefroren.

## 2.6. Aufbereitung der Blutproben

Blutbild und Differentialblutbild wurden mit den Routine-Methoden des klinisch-chemischen Labors bestimmt. Zur Berechnung der absoluten Neutrophilenzahl (Zellen/ $\mu$ l) wurde ihr relativer Anteil im Ausstrich mit der Gesamtleukozytenzahl multipliziert. Serum-CRP-Werte wurden ebenfalls in der klinisch-chemischen Routine mit einer Nachweisgrenze von 0.5 mg/dl untersucht. CRP-Werte unter 0.5 mg/dl gingen in die statistische Analyse als Null ein.

Zur Untersuchung der Neutrophilenmarker HNL und MPO im Serum wurden die Blutproben zur Koagulation für eine Stunde bei Raumtemperatur gelagert und anschließend über 10 Minuten bei 2000 g und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Das so gewonnene Serum wurde tiefgefroren und bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

## 2.7. Assays für HNL und MPO

Die Konzentration von HNL in Serum und Sputumüberstand wurde mit einem Fluor-Enzym-Immuno-Assay (Pharmacia CAP System HNL FEIA, Pharmacia, Uppsala, Schweden) untersucht. Bei diesem Forschungsassay, der zum Zeitpunkt der Studie nicht kommerziell erhältlich war, sind Anti-HNL-Antikörper an ein ImmunoCAP-System gebunden. Standards und untersuchte Proben werden hinzugefügt und das Material wird anschließend über 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Auswaschen wird  $\beta$ -Galaktosidase-konjugiertes Anti-HNL hinzugefügt und erneut 2.5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an ein erneutes Waschen wird 4-Methylumbelliferryl- $\beta$ -D-Galaktosid dazugegeben, welches zu einem nach 10 min. messbaren fluoreszierenden Produkt reagiert. Der Messbereich dieses Assays liegt bei 20 – 600  $\mu$ g/l. Der Interassay-Variations-Koeffizient beträgt 4.6 – 6 % für HNL-Konzentrationen von 53 – 462  $\mu$ g/l [67].

MPO in Serum und Sputumüberstand wurde mit einem sensitiven und spezifischen, kompetitiven Radioimmunoassay (Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Schweden) bestimmt. Der Interassay-Variations-Koeffizient liegt bei <8 % [73].

## **2.8. Statistische Berechnungen**

Die nicht-parametrische Verteilung der Lungenfunktionswerte und Inflammationsmarker wurde anhand graphischer Darstellung sowie durch Anwendung eines modifizierten Kolmogorov-Smirnov-Tests (Lilliefors) und des Shapiro-Wilks-Tests gezeigt. Die deskriptiven statistischen Ergebnisse wurden entsprechend in Form des Medians mit dem jeweiligen Quartilabstand angegeben. Für vergleichende Analysen wurden nicht-parametrische Tests verwendet: Der Wilcoxon-Test bzw. der Friedman-Test für verbundene Stichproben und der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben. Korrelationskoeffizienten wurden mit Hilfe des Kendall-Tau-B-Tests errechnet.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0.05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Programmsystem SPSS Version 10.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Vergleich der beiden Patientengruppen

Die beiden Gruppen von Patienten mit und ohne akute pulmonale Exazerbation wurden bezüglich ihrer Lungenfunktion (FEV1 als ein Parameter der zentralen bronchialen Obstruktion und MEF50 als Parameter der peripheren Obstruktion), der systemischen Entzündungsaktivität (CRP, Neutrophilenzahl, Serum-HNL und Serum-MPO) sowie der lokalen neutrophilen Entzündungsaktivität im Bereich der Atemwege (Konzentration von HNL und MPO im Sputumüberstand) verglichen. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tab. 3 und Abb. 1 dargestellt.

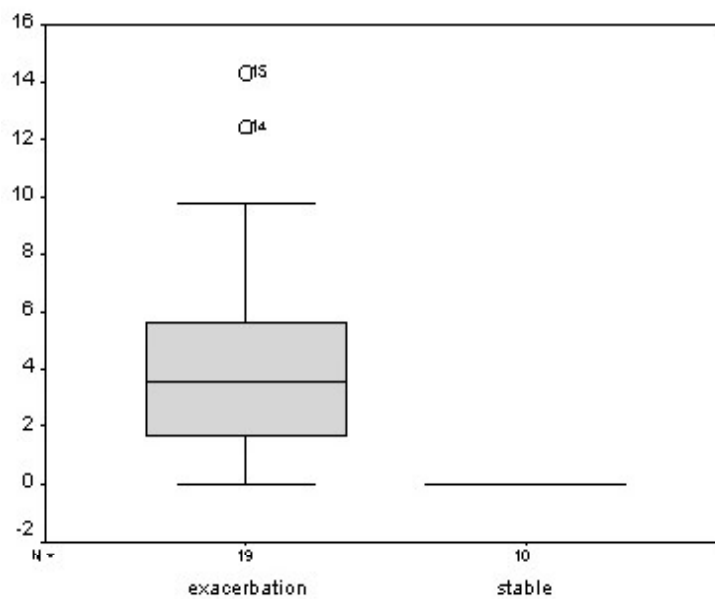
*Tabelle 3:* Lungenfunktion und Entzündungsparameter bei pulmonaler Exazerbation gegenüber Patienten im Intervall

	<b>Exazerbation (n = 19)</b>	<b>Intervall (n = 10)</b>	<b>p-Wert</b>
FEV1 [% des Sollwerts]	68.0 (44.0 – 85.9)	95.4 (70.7 – 103.9)	0.019 *
MEF50 [% des Sollwerts]	30.0 (14.5 – 55.3)	77.0 (51.0 – 88.2)	0.002 **
CRP [mg/dl]	3.6 (1.6 – 6.4)	0	<0.001 ***
Neutro [Zellen/ $\mu$ l]	11371 (7938 – 14712)	4495 (3647 – 5063)	<0.001 ***
HNL Serum [ $\mu$ g/l]	203 (152 – 304)	91.0 (85.5 – 149.5)	0.007 **
MPO Serum [ $\mu$ g/l]	810 (475 – 1325)	287.0 (171.5 – 436.5)	0.004 **
HNL Sputum [mg/l]	36.0 (15.1 – 53.3)	11.0 (6.8 – 24.1)	0.03 *
MPO Sputum [mg/l]	58 (16.2 – 83.5)	12.6 (6.4 – 17.4)	0.013 *

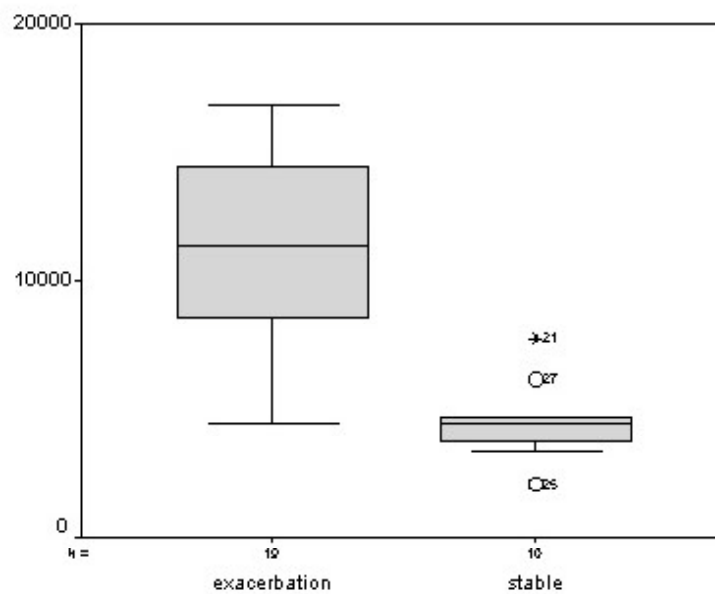
Die Ergebnisse werden als Median (Quartile 1 bis Quartile 3) gezeigt; die p-Werte zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an (Mann-Whitney-U-Test)

Bei allen Parametern zeigte sich ein Unterschied zwischen Individuen mit und ohne Exazerbation. Eine hohe Signifikanz fand sich bei den Parametern der systemischen Entzündungsaktivität (CRP, Neutrophilenzahl, Serum-HNL und Serum-MPO).

*Abbildung 1:* Vergleich systemischer Entzündungsparameter bei Patienten mit und ohne pulmonale Exazerbation

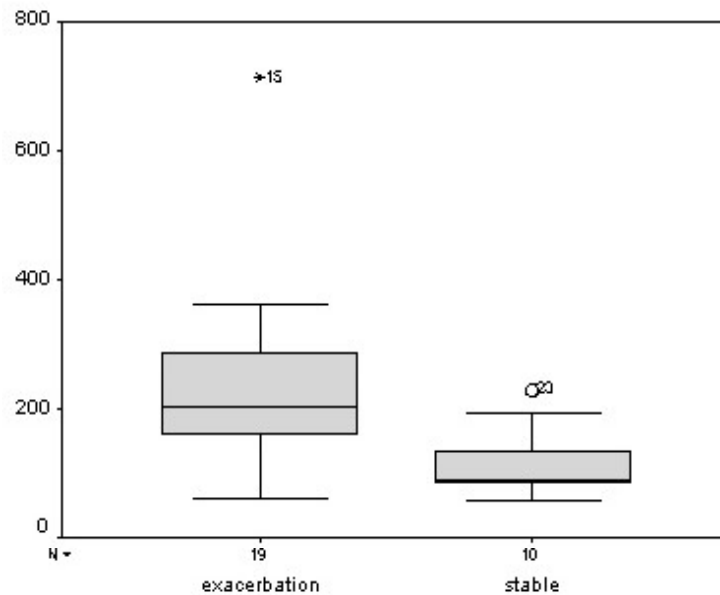


a.) CRP [mg/dl],  $p < 0.001^{***}$

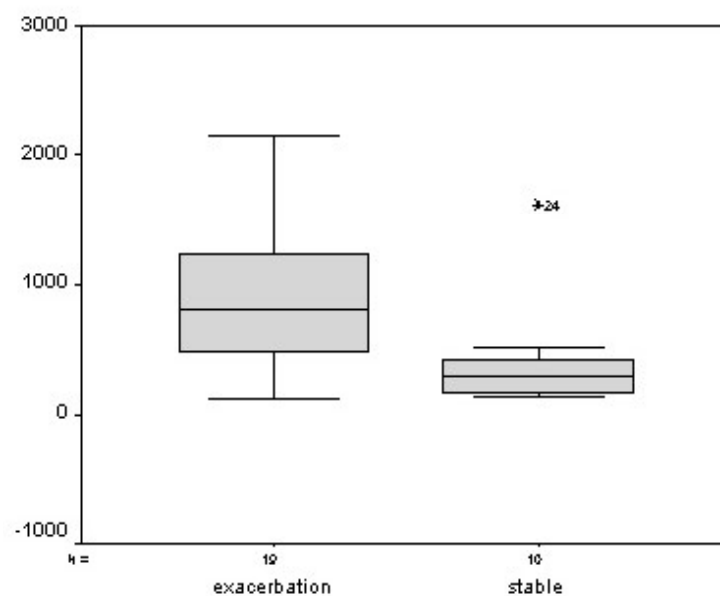


b.) Neutrophile [Zellen/ $\mu$ l],  $p < 0.001^{***}$

*Forts. Abbildung 1:* Vergleich systemischer Entzündungsparameter bei Patienten mit und ohne pulmonale Exazerbation



c.) Serum-HNL [µg/l],  $p = 0.007^{**}$



d.) Serum-MPO [µg/l],  $p = 0.004^{**}$

Die Boxplots zeigen Median, Quartile 1 und 3, Spanne und Ausreisser. Links jeweils mit Exazerbation, rechts jeweils stabile Patienten im Intervall (Mann-Whitney-U-Test)

Für unterschiedliche Trennwerte wurde die jeweilige Sensitivität mit der korrelierenden Spezifität der systemischen Inflammationsmarker verglichen. Als optimale Trennwerte (mit gleichzeitig hoher Sensitivität und Spezifität) ergaben sich 1 mg/dl für CRP, 5000 Zellen/ $\mu$ l für die Neutrophilenzahl, 150  $\mu$ g/l für Serum-HNL und 500  $\mu$ g/l für Serum-MPO. Bei diesen cut-off-Werten lag die Sensitivität zur Diagnose einer akuten pulmonalen Exazerbation bei 74 % für MPO, bei jeweils 79 % für HNL und CRP sowie 95 % bei der absoluten Neutrophilenzahl. Die Spezifität betrug 100 % für CRP und jeweils 80 % für Neutrophile, HNL und MPO. Auffällig war, dass in den vier Fällen mit negativem CRP das HNL erhöht war und dass alle vier Fälle mit negativem HNL ein erhöhtes CRP hatten. Die Kombination der beiden Parameter erzielte also eine Sensitivität von 100 %. Ebenso war durch die Kombination von absoluter Neutrophilenzahl mit CRP oder von Neutrophilen mit HNL eine Abgrenzung aller Fälle mit Exazerbation möglich.

### **3.2. Verlauf unter i.v.-Therapie**

In der Gruppe von Patienten mit pulmonaler Exazerbation konnte in 16 Fällen der Verlauf von Lungenfunktion und Inflammationsmarkern unter der Therapie beobachtet werden. Hierzu wurden Serum-CRP, Neutrophilenzahl, Serum- und Sputum-HNL, Serum- und Sputum-MPO sowie die entsprechenden Lungenfunktionswerte (FEV1 und MEF50) jeweils vor der Therapie mit den Werten am Ende der Behandlung verglichen (Tab. 4 und 5). Die Pseudomonas-wirksame Behandlung war mit einem hochsignifikanten Rückgang des Serum-HNL verbunden. Diese Abnahme war in etwa vergleichbar mit den Veränderungen bei CRP, Neutrophilenzahl und Serum-MPO. Wie zu erwarten, kam es ebenfalls zu einer hochsignifikanten Verbesserung der Lungenfunktionsparameter. Dagegen konnte im Sputum keine signifikante Verminderung der Neutrophilenmarker HNL und MPO beobachtet werden (Abb.2).

*Tabelle 4:* Lungenfunktion und CRP bei pulmonaler Exazerbation: Vor Beginn und am Ende der intravenösen antibiotischen Behandlung

	<b>vor AB (n = 19)</b>	<b>Ende AB (n = 16)</b>	<b>p-Wert (n = 16)</b>
FEV1 [% des Sollwerts]	68.0 (44.0 – 85.9)	84.6 (54.2 – 95.4)	0.001 ***
MEF50 [% des Sollwerts]	30.0 (14.5 – 55.3)	44.6 (26.5 – 68.5)	0.006 **
CRP [mg/dl]	3.6 (1.6 – 6.4)	0.45 (0 – 1.38)	0.001 ***

Die Ergebnisse werden als Median (Quartile 1 bis Quartile 3) gezeigt; die p-Werte zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an (Wilcoxon-Test, zeilenweiser Fallabschluss)

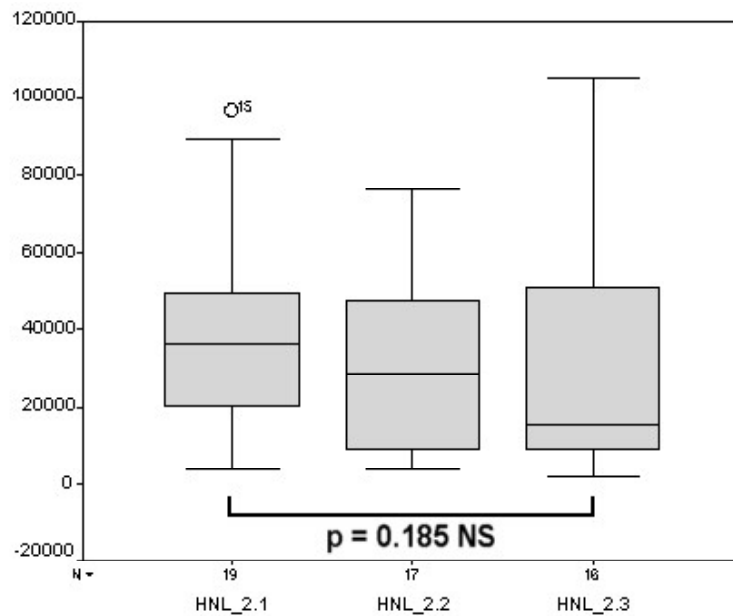
*Tabelle 5:* Neutrophilenmarker: Vor, während und am Ende der antibiotischen Behandlung

	<b>vor AB (n = 19)</b>	<b>Tag 4 bis 5 (n = 16)</b>	<b>Ende AB (n = 16)</b>	<b>p (n = 16)</b>
HNL Serum [µg/l]	203 (152 – 304)	154 (80 – 215)	107.5 (58.2 – 143.8)	<0.001 ***
MPO Serum [µg/l]	810 (475 – 1325)	876 (460 – 1020)	594 (382 – 781)	0.005 **
HNL Sputum [mg/l]	36.0 (15.1 – 53.3)	28.7 (9.0 – 49.6)	15.2 (8.5 – 51.5)	0.185 N.S.
MPO Sputum [mg/l]	58 (16.2 – 83.5)	54 (27 – 105)	28.5 (15.5 – 93.7)	0.717 N.S.
Neutro [Zellen/µl]	11371 (7938 – 14712)	8064 (4763 – 11943)	5390 (4020 – 6768)	<0.001 ***

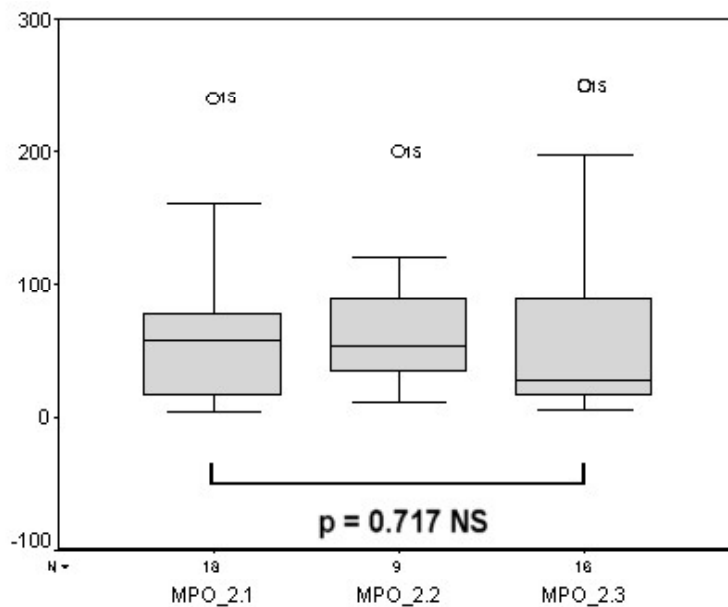
Die Ergebnisse werden als Median (Quartile 1 bis Quartile 3) gezeigt; die p-Werte zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an (Friedman-Test, zeilenweiser Fallabschluss); N.S. = nicht signifikant



Abbildung 2: Verlauf neutrophiler Entzündungsmarker im Sputum während antibiotischer Behandlung



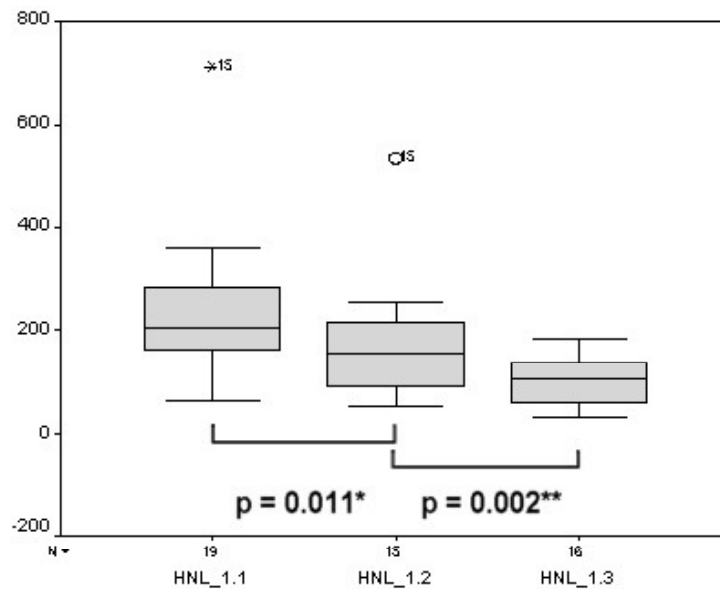
a.) HNL\_2.1/2/3: HNL [ $\mu\text{g/l}$ ] im Sputum vor/während/am Ende der Antibiotikatherapie



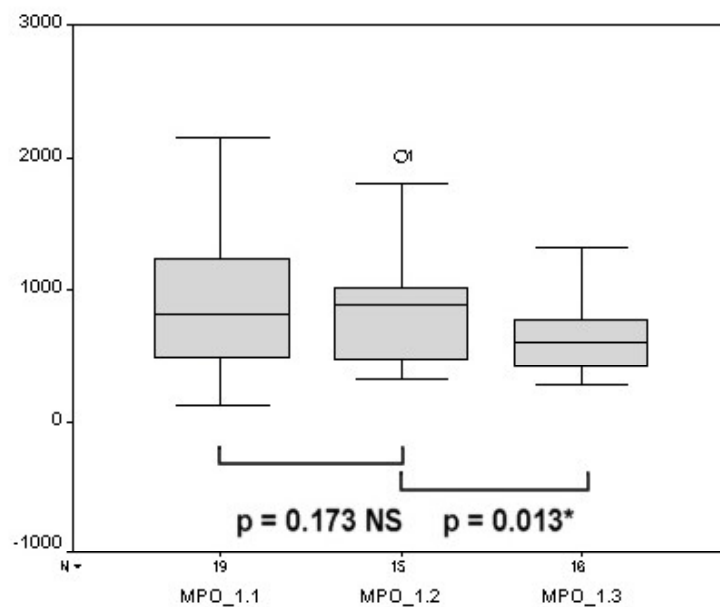
b.) MPO\_2.1/2/3: MPO [ $\text{mg/l}$ ] im Sputum vor/während/am Ende der Antibiotikatherapie

Die Boxplots zeigen Median, Quartile 1 und 3, Spanne und Ausreisser  
Die p-Werte zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen an (Friedman-Test).

Abbildung 3: Rückgang neutrophiler Entzündungsmarker im Serum während antibiotischer Behandlung

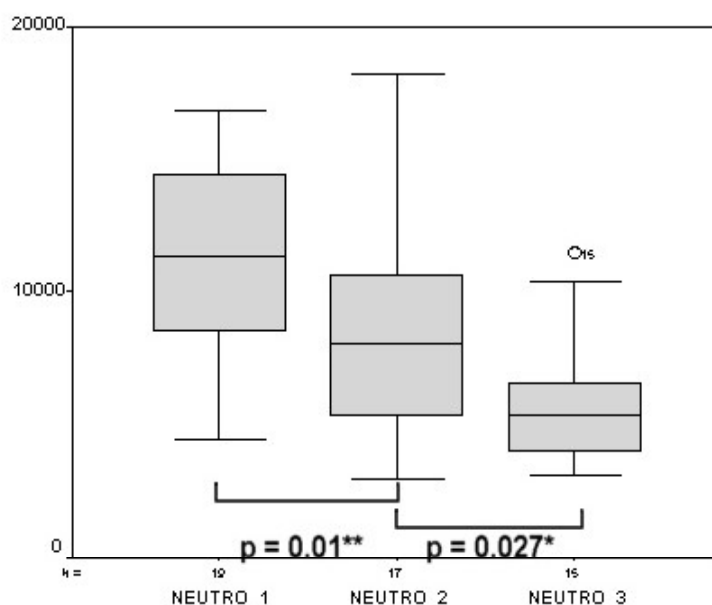


a.) HNL\_1.1/2/3: HNL [µg/l] im Serum vor/während/am Ende der Antibiotikatherapie



b.) MPO\_1.1/2/3: MPO [µg/l] im Serum vor/während/am Ende der Antibiotikatherapie

*Forts. Abbildung 3:* Rückgang neutrophiler Entzündungsmarker im Serum während antibiotischer Behandlung



c.) Neutro\_1/2/3: Neutrophile [Zellen/μl] vor/während/am Ende der Antibiotikatherapie

Die Boxplots zeigen Median, Quartile 1 und 3, Spanne und Ausreisser. Die p-Werte zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an (Wilcoxon-Test).

Die Neutrophilenmarker wurden während der ersten Behandlungstage auf ihre Änderung unter der Antibiotikatherapie untersucht. Die Werte für Serum-HNL zeigten dabei einen kontinuierlichen Rückgang vom Beginn der Behandlung bis zu ihrem Ende, während die Verringerung der Serum-MPO-Werte in den ersten Tagen nicht signifikant war. Die Zahl der Neutrophilen ging nach Behandlungsbeginn rasch und sehr signifikant zurück. Diese Abnahme setzte sich bis zum Behandlungsende fort (Abb. 3). Verglichen mit diesen Beobachtungen fand sich bei den elektiv behandelten Patienten der Kontrollgruppe (n = 3) kein relevanter Rückgang der Serum-HNL (91 μg/l vs. 74) und Serum-MPO-Werte (287 μg/l vs. 234).

Die Messwerte nach Antibiotikatherapie in der Gruppe mit Exazerbation wurde mit den Ausgangswerten der stabilen Kontrollgruppe verglichen. Wir gingen dabei von der

Annahme aus, dass es zwischen den Inflamationsmarkern der Patienten nach Abschluss der Behandlung (wenn sie in einen stabilen Zustand zurückgekehrt waren) und den Werten bei der stabilen Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied mehr geben sollte. Zum Vergleich wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. In der Tat waren die Unterschiede für das Serum-HNL ( $p = 0.979$ ), Sputum-HNL ( $p = 0.452$ ), die Neutrophilenzahl ( $p = 0.222$ ) und das FEV1 ( $p = 0.188$ ) statistisch nicht signifikant. Andererseits waren die MEF50-Werte noch leicht unterschiedlich ( $p = 0.027$ ). Unerwartet waren die noch signifikant höheren CRP-Werte (0.45 mg/dl vs. 0,  $p = 0.01$ ) und Serum-MPO-Werte (594  $\mu\text{g/l}$  vs. 287,  $p = 0.006$ ) der antibiotisch behandelten Patienten nach Exazerbation, verglichen mit den Basiswerten der stabilen Kontrollen. Ähnlich galt dies für die Sputum-MPO-Werte (28.5 mg/l vs. 12.6,  $p = 0.016$ ).

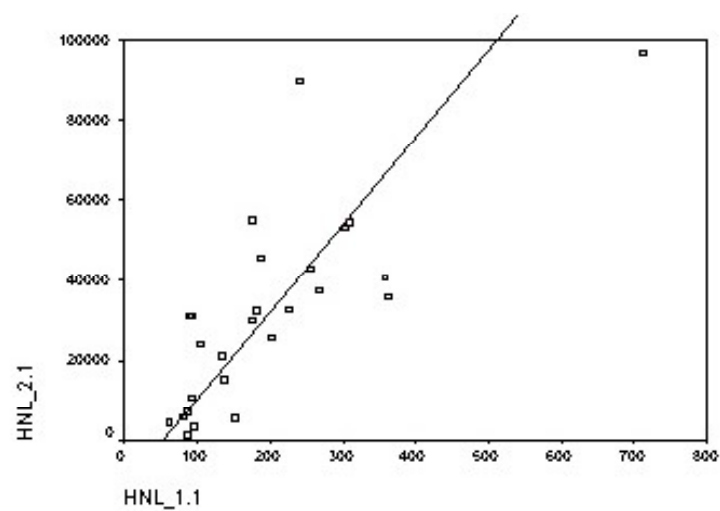
### 3.3. Korrelationen

Für die Gesamtzahl der Fälle wurde die Korrelation von Neutrophilenmarkern mit klinischen Parametern und konventionellen Laborwerten untersucht (Tag 0,  $n = 29$ ). Es konnte keine signifikante Beziehung zwischen Lungenfunktion und HNL in Serum und Sputum gefunden werden. Andererseits war die MPO mit dem MEF50 und geringfügig mit dem FEV1 korreliert. Eine gering signifikante Korrelation mit dem CRP ergab sich für die Serum-HNL-Werte und vergleichbar für die MPO in Serum und Sputum (Tab. 6). Die Neutrophilenmarker standen in deutlicher Beziehung zueinander. Dies galt vor allem für das Serum-HNL gegenüber den HNL-Werten im Sputum (Abb. 4). Es wurde ebenfalls eine signifikante Verbindung zwischen HNL und MPO im Serum gefunden ( $r = 0.298$ ,  $p = 0.023$ ). Der Korrelationskoeffizient für Serum-HNL zur Neutrophilenzahl betrug 0.22 (nicht signifikant). MPO im Serum zeigte eine schwache Korrelation zur MPO im Sputum ( $r = 0.29$ ,  $p = 0.042$ ).

*Tabelle 6:* Korrelation neutrophiler Marker mit CRP und Lungenfunktion (Kendall-Tau-B-Test); n = 29

	<b>CRP</b>	<b>FEV1</b>	<b>MEF50</b>
Neutrophilenzahl	0.484 (p = 0.001)	-0.119; N.S.	-0.291; p = 0.027
HNL im Serum	0.31 (p = 0.027)	-0.185; N.S.	-0.249; N.S.
HNL im Sputum	0.277; N.S.	-0.053; N.S.	-0.216; N.S.
MPO im Serum	0.302; (p = 0.031)	-0.306; p = 0.02	-0.346; p = 0.009
MPO im Sputum	0.31; (p = 0.04)	-0.274; N.S.	-0.308; p = 0.032

*Abbildung 4:* Korrelation von HNL im Serum mit HNL im Sputum



HNL\_1.1: Serum, HNL\_2.1: Sputum [ $\mu\text{g/l}$ ];  $r = 0.625$ ,  $p < 0.001$

Bezogen auf die Gesamtzahl der stabilen Patienten (nach Beendigung der Antibiotikatherapie sowie Patienten der Kontrollgruppe) fand sich eine geringfügige Relation der Neutrophilenmarker zum Shwachman-Score und zum FEV1/FVC-Quotienten, jedoch nicht zur FVC (Tab. 7).

*Tabelle 7:* Krankheitsschweregrad und neutrophile Inflammationsmarker (Kendall-Tau-B-Test; n = 17)

	<b>HNL im Serum</b>	<b>MPO im Serum</b>
Shwachman-Kulczycki-Score	-0.432 (p = 0.022)	-0.430 (p = 0.022)
FVC	-0.037; N.S.	-0.044; N.S.
FEV1/FVC	-0.385 (p = 0.032)	-0.258; N.S.

(Die Neutrophilenzahl war nicht mit dem Krankheitsschweregrad assoziiert)

## **4.Diskussion**

### **4.1. Neutrophilenmarker im Serum**

#### **4.1.1. Diagnose einer akuten pulmonalen Exazerbation**

Die Diagnose einer akuten pulmonalen Exazerbation bei Patienten mit CF und chronischer Pseudomonasinfektion wird normalerweise anhand klinischer Symptome und klinischer Befunde gestellt. Entsprechende Scores wurden beispielsweise von Rosenfeld et al. für die Verwendung in klinischen Studien evaluiert [50].

In unserer Studie sollten virale, selbstlimitierende Atemwegsinfektionen durch die im Studienprotokoll geforderte Dauer der Beschwerden von mehr als einer Woche vor Aufnahme weitgehend ausgeschlossen werden. Eine Unterscheidung von interkurrenten viralen Atemwegsinfektionen erfolgt sonst meist mit Hilfe konventioneller Laborparameter wie CRP, Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) oder weißem Blutbild. Obwohl diese Parameter im klinischen Alltag breite Anwendung finden, gibt es nur wenige Daten zu ihrer Sensitivität und Spezifität für die Diagnose einer akuten pulmonalen Exazerbation bei CF. Viele Autoren, welche den diagnostischen Wert des CRP für diese Indikation untersuchten, wählten einen cut-off-Wert von 1 mg/dl. Dieser Wert wird allgemein als die obere Grenze für gesunde Individuen angesehen [67, 74, 75]. In der Arbeit von Glass et al. [75] wurden die Werte für Sensitivität und Spezifität nicht ausdrücklich veröffentlicht. Aus den publizierten Einzelwerten der 12 Patienten und 12 Kontrollen errechnen sich für das CRP jedoch jeweils 100% für Sensitivität und Spezifität (cut-off 1 mg/dl). Eichler et al. fanden für das CRP eine Sensitivität von 95 % und eine Spezifität von 78 %, was für diesen cut-off-Wert mit unseren Ergebnissen vergleichbar war [67]. In einer Studie von Watkin et al. [76] erreichte das CRP eine Sensitivität von 49 % und eine Spezifität von 83%, allerdings bei einem cut-off-Wert von 0.182 mg/dl. In dieser Arbeit wurden jedoch nur Patienten unter 10 Jahren

untersucht, welche eine Exazerbation durch *H. influenzae* oder *S. aureus* hatten und nicht mit *P. aeruginosa* infiziert waren.

In unserer und vielen anderen Studien zeigte sich, dass eine akute pulmonale Exazerbation bei Patienten mit CF und chronischer Pseudomonasinfektion meist mit einem nur gering erhöhten CRP-Wert verbunden ist, in einer Größenordnung von oft weit unter 10 mg/dl [74, 75, 77, 78, 79]. Das eigentliche Problem beim CRP scheint zu sein, dass ein cut-off-Wert von 1 mg/dl zu niedrig ist, um eine akute pulmonale Exazerbation von einem viralen Atemwegsinfekt bei CF-Patienten zu unterscheiden. So fand sich in einer Untersuchung von Pribble et al. [80] ein positives CRP bei 67 % der Patienten mit nicht-bakteriell bedingter Exazerbation (mit Nachweis von Influenza A oder B-Virus, RS-Virus, Rhinovirus, Parainfluenza-Virus und anderen) im Vergleich zu 47 % der Patienten mit Exazerbationen, bei denen keine solchen viralen Infektionen nachgewiesen wurden. Zugrunde lag ein cut-off-Wert von 0.59 mg/dl. Insbesondere Patienten mit Influenza wiesen höhere CRP-Werte (im Mittel  $\pm$  SD:  $3.8 \pm 4.0$  mg/dl) auf, als Patienten mit mutmaßlich bakteriell bedingter Infektion ( $1.7 \pm 2.0$  mg/dl,  $p < 0.05$ ).

Die Studie von Xu et al. untersuchte die Messung von Serum-HNL und Serum-CRP zur Unterscheidung akuter bakterieller Infektionen von viralen Infektionen bei Patienten, die nicht an CF erkrankt waren [66]. Als optimaler cut-off-Wert zur Diagnose einer bakteriellen Infektion wurde ein CRP von 5 mg/dl angesehen. Dabei lag die Sensitivität bei 82 %, die Spezifität bei 81 %. Wenn man diesen Trennwert bei den Patienten unserer Studie zugrunde legen würde, fände sich für das CRP eine zweifellos unbrauchbare Sensitivität von 26 % zur Identifikation einer mutmaßlich bakteriell bedingten pulmonalen Exazerbation. Eine Unterscheidung viraler und bakteriell (insbesondere Pseudomonas-) bedingter pulmonaler Exazerbationen anhand des CRP scheint damit in einem Bereich der Werte zwischen 1 und 5 mg/dl kaum möglich zu sein.

Daten zum diagnostischen Wert anderer konventioneller Laborwerte bei der Erkennung akuter pulmonaler Exazerbationen von CF-Patienten gibt es kaum. Glass et al. beschrieben eine weite Streuung für die Gesamt-Leukozytenzahl zwischen den Gruppen



mit und ohne Exazerbation. Bei der BSG war die diagnostische Aussagekraft besser, jedoch zeigte sich eine weite Streuung der Werte in der Gruppe mit Exazerbation sowohl vor als auch nach antibiotischer i.v.-Therapie [75].

Als eine bessere Möglichkeit zur laborchemischen Diagnose bakteriell bedingter pulmonaler Exazerbationen bei *Pseudomonas*-besiedelten CF-Patienten erscheint die Bestimmung spezifischer Neutrophilenmarker im Serum. Dabei wird das HNL als ein idealer Neutrophilenmarker angesehen [51]. Xu et al. konnten zeigen, dass die Bestimmung von Serum-HNL im Vergleich zum CRP eine deutlich bessere Sensitivität (97 %) und Spezifität (96 %) zur Erkennung unterschiedlicher bakterieller Infektionen bei Nicht-CF-Patienten besitzt [66]. Der hierzu korrespondierende cut-off-Wert von 155 µg/l wurde als optimal betrachtet. Eichler et al. verglichen Serum-HNL mit Serum-MPO, Lactoferrin und CRP zur Diagnose akuter pulmonaler Exazerbationen bei CF-Patienten mit chronischer *Pseudomonas*infektion [67]. Die Ergebnisse dieser früheren Studie waren mit unseren Resultaten vergleichbar, wenn auch mit einer höheren Sensitivität (100 %) und Spezifität (91 %) beim Serum-HNL (Trennwert: 200 µg/l). Der für unsere Patienten gefundene cut-off-Wert für das Lipocalin (150 µg/l) liegt hingegen sehr nahe bei dem Ergebnis aus der Untersuchung von Xu [66] zur Unterscheidung bakterieller und viraler Infektionen (155 µg/l). Als Schlussfolgerung aus unseren und den genannten früheren Ergebnissen erscheint der Wert des HNL im Serum als ein geeigneter Parameter für die Diagnose einer akuten pulmonalen Exazerbation bei CF und für deren Unterscheidung von viralen respiratorischen Infekten.

Unabhängig davon war die hohe Sensitivität (95 %) und Spezifität (80 %) bei der Neutrophilenzahl im Differentialblutbild (cut-off-Wert 5000/µl) ein überraschendes Ergebnis der vorliegenden Untersuchung. Dieses Resultat war unerwartet, nachdem frühere Studien lediglich die Gesamtleukozytenzahl betrachteten [75] oder aber zum diagnostischen Wert der Neutrophilenzahl keine Aussage machten [67, 72, 74, 77, 79, 81]. Die absolute Neutrophilenzahl als eine einfache und überall verfügbare Untersuchung scheint in ihrer Bedeutung für die Diagnose pulmonaler Exazerbationen unterschätzt zu werden. Sie sollte sowohl im klinischen Alltag als auch bei späteren Studien eine größere Berücksichtigung finden. Eine mögliche Einschränkung dieser

Methode ist, dass die Zahl der Neutrophilen im Blut das Resultat ihres Zellumsatzes darstellt. Insbesondere bei schwerwiegenden systemischen Infektionen kann der Zellverbrauch zu einem Abfall und im extremen Fall zur Leukopenie führen, was eine Maskierung der Zellaktivität bedeuten würde. Im Gegensatz hierzu wird davon ausgegangen, dass das Serum-HNL nicht nur die Zahl der Neutrophilen, sondern auch deren Aktivität widerspiegelt [51]. Dies ist möglicherweise auch der Grund dafür, dass in unserer Arbeit keine signifikante Korrelation zwischen der Neutrophilenzahl und dem Serum-HNL gefunden werden konnte.

#### **4.1.2. Serum-Neutrophilenmarker unter i.v.-Therapie**

In unserer Studie führte die intravenöse antibiotische Behandlung der pulmonalen Exazerbation schon in den ersten Behandlungstagen zu einem Rückgang der Serum-HNL-Werte. Das Serum-HNL spricht offenbar frühzeitig auf die antibiotische Behandlung an, was in vergleichbarer Weise auch für die Neutrophilenzahl zu beobachten war. Die Abnahme des Serum-HNL und der Neutrophilenzahl setzte sich im weiteren Verlauf der i.v.-Therapie fort. Am Ende der Behandlung war bei diesen beiden Parametern auch kein signifikanter Unterschied mehr zu den Baseline-Werten der stabilen Kontrollen zu finden. Die Erhöhung der Serum-HNL-Werte und der Neutrophilenzahl bei Patienten mit pulmonaler Exazerbation scheint somit durch frühes Ansprechen und Reversibilität unter der Antibiotikatherapie gekennzeichnet zu sein. Serum-HNL und Neutrophile erscheinen folglich als hilfreiche Parameter zur Beurteilung des Verlaufs bei akuter pulmonaler Exazerbation.

Ein Rückgang unter der Behandlung zeigte sich in unserer Studie auch bei den Serum-MPO-Werten. Allerdings war die Abnahme der Serum-MPO in den ersten Behandlungstagen nicht signifikant und der Unterschied zwischen den Werten nach Abschluss der Therapie zu den Ausgangswerten der Kontrollgruppe war beträchtlich ( $p=0.006$ ). In einer früheren Arbeit von Koller et al. [72] wurde die Serum-MPO bei acht CF-Patienten jeweils vor und nach antibiotischer i.v.-Therapie bestimmt, wobei

sich ein hochsignifikanter Abfall zeigte ( $p < 0.0001$ ). Unseren Ergebnissen vergleichbar führte die Behandlung aber nicht zu einer Abnahme auf normale MPO-Spiegel. Der Rückgang der Serum-MPO-Werte unter Antibiotika scheint dementsprechend verspätet und unvollständig zu sein, was die MPO als Verlaufsparemeter ungeeignet macht. Möglicherweise hat die MPO im Vergleich zum HNL während der Restitution lediglich eine langsamere Kinetik. Andererseits stammen HNL und MPO aus unterschiedlichen Kompartimenten der Neutrophilen und ihre Bestimmung vermittelt demzufolge wahrscheinlich auch unterschiedliche Informationen (vgl. Abschnitt 1.4.2.). Azurophile (primäre) Granula, welche MPO und z. B. auch Elastase enthalten, werden bei Aktivierung der Neutrophilen durch Entzündungsmediatoren in geringerem Maße mobilisiert [58]. Sie sind in erster Linie für die Fusion mit phagozytischen Vakuolen bestimmt, oder ihr Inhalt wird freigesetzt, wenn die neutrophile Zelle zerfällt [58]. Hypothetisch lässt sich folgern, dass das Serum-HNL für ein frühes Stadium der neutrophilen Aktivierung steht, während die Serum-MPO möglicherweise eher einen Marker für den neutrophilen Zellzerfall darstellt. Bei der Verwendung spezifischer Neutrophilenmarker zum Therapiemonitoring scheint das Serum-HNL (in Kombination mit den Neutrophilenwerten) der Serum-MPO überlegen zu sein.

Gewöhnlich lässt sich ein Ansprechen auf die antibiotische Behandlung bei der pulmonalen Exazerbation anhand des klinischen Verlaufs und einer Verbesserung von Lungenfunktionsparametern [48, 74] und CRP-Werten [74, 75, 77] erkennen. Glass et al. untersuchten die Kinetik der CRP-Werte bei akuter pulmonaler Exazerbation und fanden einen raschen Abfall innerhalb von 48 Stunden nach Beginn einer erfolgreichen Behandlung. Die meist nur geringfügige Erhöhung der CRP-Werte bei pulmonaler Exazerbation erlaubt aber keine sichere Unterscheidung einer viralen, selbstlimitierenden Genese von einer primär (oder bei viraler Bahnung auch sekundär) bakteriell bedingten Verlaufsform [80]. Es bleibt daher unklar, wie viele Patienten unter der Pseudomonas-wirksamen i.v.-Therapie nur einen spontanen CRP-Abfall zeigen, wenn sie lediglich eine unkomplizierte virale Atemwegsinfektion haben. Nachdem die Häufigkeit für das Vorliegen einer viralen Genese bei klinisch bestehender Exazerbation in einer Größenordnung von 20 bis 39 % angegeben wird [80, 81, 82],

scheint eine Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten und des Therapiemonitoring mit Hilfe neuerer Inflammationsmarker gerechtfertigt zu sein.

#### **4.1.3. Serum-Neutrophilenmarker und Krankheitsschweregrad**

Neutrophile Granulozyten dominieren sowohl die akut entgleiste als auch die chronisch perpetuierte bronchiale Inflammation (vgl. Abschnitt 1.2.2). Unabhängig von einer Exazerbation der neutrophilen Entzündungsprozesse ist deshalb auch ein Zusammenhang der untersuchten Neutrophilenmarker zum Schweregrad der chronisch neutrophilen Inflammation und somit zum Krankheitsstadium denkbar. In der Arbeit von Eichler et al. [67] zeigte sich für das Serum-HNL eine schwache Korrelation zum Shwachman-Kulczycki-Score. Bei der Studie handelte es sich jedoch um eine Querschnittserhebung, bei welcher 45 % der Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung eine pulmonale Exazerbation hatten. Nachdem bei diesen Patienten das Serum-HNL mit großer Wahrscheinlichkeit vor allem durch die akute Verschlechterung erhöht war, ist die gefundene Korrelation zum Schweregrad möglicherweise mit einer Verzerrung behaftet. Ähnliches gilt für die Erhebung von Koller et al. [83], bei welcher ein Zusammenhang zwischen Shwachman-Score und Serum-MPO bestand. Auch hier wurden knapp 40 % der Patienten zum Zeitpunkt einer pulmonalen Exazerbation mit entsprechend akuter Erhöhung der MPO-Werte untersucht. In unserer Studie sollte dieser Einflussfaktor bereinigt werden. So gingen in die Berechnung der Korrelation von Neutrophilenmarker und Krankheitsschweregrad nur stabile Patienten (nach Abschluss der i.v.-Therapie oder Patienten der Kontrollgruppe) ein. Dessen ungeachtet war für die Serum-HNL- und Serum-MPO-Werte eine, wenn auch geringe, Korrelation zum Krankheitsschweregrad zu finden. Obwohl die Neutrophilenmarker in erster Linie Parameter der Krankheitsaktivität zu sein scheinen, stellen sie wohl zumindest teilweise auch ein Maß für das Krankheitsstadium dar. Diese Vorstellung lässt sich mit einem hypothetischen Modell der neutrophilen Entzündung bei CF vereinbaren, bei welchem

eine allmählich ansteigende Baseline mit periodisch auftretenden, akuten Verschlechterungen überlagert wird.

## **4.2. Neutrophilenmarker im Sputum**

In unserer Studie ergab sich eine enge Korrelation der Serum-HNL-Werte mit den Konzentrationen des HNL im Sputumüberstand. In geringerer Ausprägung konnte auch eine Assoziation von Serum-MPO und Sputum-MPO gezeigt werden. Der Zusammenhang von Serum- und Sputumwerten bei zellulären Inflamationsmarkern wurde für CF-Patienten schon von Koller et al. beschrieben [72]. Bei dieser früheren Studie fand sich eine enge Relation der Serum- und Sputumwerte jeweils für den Eosinophilenmarker ECP und für die auch von uns untersuchte MPO.

Beim Vergleich unserer Patientengruppe mit pulmonaler Exazerbation mit den stabilen Kontrollpatienten verhielten sich die Sputumwerte der Neutrophilenmarker ähnlich wie die Serumwerte. HNL und MPO im Sputum waren bei pulmonaler Exazerbation erhöht, wenn auch mit geringerer Signifikanz als die Serumwerte.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte für die Sputumwerte von HNL und MPO überraschenderweise kein signifikanter Rückgang unter der antibiotischen Therapie beobachtet werden. Widersprüchliche Daten bei der Untersuchung von Sputumkonzentrationen von Inflamationsmarkern sind allgemein häufig. Sie werden vor allem mit methodischen Problemen der Sputumgewinnung und –verarbeitung in Zusammenhang gebracht [84]. Des weiteren besteht bei der kleinen Fallzahl unserer Studie auch die Gefahr, einen Fehler zweiter Art zu begehen und die Nullhypothese aufgrund des Ergebnisses fälschlicherweise beizubehalten. Bei einem p-Wert von 0.185 kommt dies vor allem für das Sputum-HNL in Frage.

Dennoch könnte ein fehlender Rückgang der Inflamationsmarker im Sputum unter der Antibiotikatherapie eine wichtige Beobachtung darstellen. Der fehlende Abfall der Werte könnte bedeuten, dass der in den Atemwegen lokalisierte Entzündungsprozess

durch eine systemische Antibiotikatherapie nur schwer zu kontrollieren ist. In der Literatur finden sich hierzu nur wenige und teilweise ebenfalls widersprüchliche Daten. Ordonez et al. untersuchten Inflammationsmarker bei akuter Exazerbation in induziertem Sputum von CF-Patienten vor und nach antibiotischer Therapie. Neben einer Verbesserung der Lungenfunktionsparameter zeigte sich ein signifikanter, jedoch moderater Rückgang von IL-8, freier Neutrophilen-Elastase, Neutrophilenzahl und Gesamtleukozytenzahl. Die Autoren postulierten, dass eine potente antiinflammatorische Therapie zu einer besseren Kontrolle der Atemwegsentszündung führen könnte [85]. Meyer et al. fanden eine Abnahme von neutrophile-Elastase- $\alpha$ 1-Antiprotease-Komplex in der bronchoalveolären Lavage [86], übereinstimmend mit der Arbeit von Nixon et al. [77], bei welcher neutrophile Elastase in der Sputum-Sol-Phase untersucht wurde. Allerdings ergab sich in letzterer Studie keine Veränderung für TNF- $\alpha$  und es wurde sogar ein Anstieg des IL-6 beschrieben, für welchen es keine befriedigende Erklärung gab [77]. Analoge Ergebnisse wurden von Cunningham et al. publiziert, die unter Antibiotikatherapie für keines der untersuchten Sputumzytokine eine signifikante Reduktion fanden [87]. Vergleichbar mit unserer o. g. Hypothese schlossen die Autoren, dass die Pseudomonas-wirksame i.v.-Therapie zu keiner befriedigenden Kontrolle der Atemwegsinfektion führt. In einer Studie mit zehn CF-Patienten untersuchten Niggemann et al. unter anderem die Veränderung der MPO in Serum und Sputumüberstand während i.v.-antibiotischer Behandlung außerhalb pulmonaler Exazerbationen. Wie auch in unserer Arbeit zeigte sich ein signifikanter Rückgang bei den Serumwerten, nicht aber bei den Sputumwerten [88]. Als mögliche Erklärung für eine persistierende Entzündungsreaktion in den Atemwegen trotz vorangehender Antibiotikatherapie wurde von Ordonez et al. angeführt, dass das Atemwegsepithel eine überschießende Reaktion auf die Infektion zeigt und dass diese lange anhält, auch nachdem der infektiöse Stimulus wegfiel [85, 89]. Andererseits jedoch konnte in der Arbeit von Cunningham et al. keine verzögerte Besserung der Sputuminflammationsmarker in den Wochen nach Ende der Antibiotikatherapie gefunden werden. Vielmehr hielt auch die Verbesserung der Lungenfunktion nur eine Woche nach i.v.-Therapie an und das FEV1 erreichte schon nach vier Wochen die

Ausgangswerte vom Zeitpunkt vor der antibiotischen Behandlung [87]. Auch diese klinische Beobachtung spricht für einen zumindest teilweise anhaltenden Entzündungsprozess selbst nach antiinfektöser Therapie. Ein solches Anhalten der neutrophilen Inflammation in den Atemwegen ist möglicherweise das Ergebnis selbst-perpetuierender Mechanismen, welche zu einer fortgesetzten, von der Anwesenheit bakterieller Stimuli unabhängigen Aktivierung neutrophiler Granulozyten führen (vgl. Abschnitt 1.2.2., [39]).

Eine verbesserte Kontrolle des lokalen Entzündungsprozesses in den Atemwegen bei CF-Patienten könnte vermutlich durch eine Modifikation gängiger Behandlungsstrategien erzielt werden. Vorstellbar wäre etwa eine kurzzeitige Behandlung mit systemisch verabreichten Kortikosteroiden während der Antibiotikatherapie pulmonaler Exazerbationen. Als weitere Möglichkeit käme eventuell auch eine anhaltende Suppression der Entzündung durch regelmäßige, etwa vierteljährliche i.v.-Therapien in Frage, wie sie in dieser Form vom Kopenhagener CF-Zentrum eingeführt wurden [49].

### **4.3. Schlussfolgerungen**

- Als Ergebnis der vorliegenden Arbeit und in Übereinstimmung mit der früheren Untersuchung von Eichler et al. [67] lässt sich schließen, dass das HNL im Serum einen sensitiven und spezifischen Marker für die Diagnose einer akuten pulmonalen Exazerbation bei CF-Patienten mit chronischer Pseudomonasinfektion darstellt. Es ist für die Unterscheidung von selbstlimitierenden viralen Infekten möglicherweise besser geeignet als das CRP.

- Die absolute Neutrophilenzahl im Blut besitzt einen hohen diagnostischen Wert für die pulmonale Exazerbation und sollte im klinischen Alltag und bei weiteren Studien größere Beachtung finden.
- HNL im Serum und die absolute Neutrophilenzahl sind geeignete Parameter für ein Monitoring des Therapieerfolgs bei antibiotischer Behandlung akuter Exazerbationen.
- Bei Messung des Serum-HNL im Intervall ist dessen Höhe nur in geringem Maße mit dem Krankheitsschweregrad assoziiert.
- Serum-HNL und Sputum-HNL zeigen eine gute Korrelation zueinander. Dennoch verhalten sie sich nicht in jedem Fall gleichförmig. Serumwerte spiegeln lediglich die systemisch erkennbare Entzündungsreaktion wider. Sie sind nur Surrogatparameter für die destruktive neutrophile Inflammation im eigentlich betroffenen Organ, der Lunge.
- Der Verlauf der Sputum-HNL- und -MPO-Werte unter antibiotischer Therapie sowie weitere frühere Beobachtungen deuten möglicherweise darauf hin, dass die in den Atemwegen lokalisierte neutrophile Entzündung durch eine antiinfektiöse Behandlung nicht ausreichend kontrolliert wird. Neue Behandlungsstrategien, insbesondere etwa die Kombination mit einer zeitlich begrenzten antiinflammatorischen Therapie, sollten entsprechend evaluiert werden.



## 5. Zusammenfassung

**GRUNDLAGEN:** Die pulmonale Erkrankung bei cystischer Fibrose (CF) ist durch chronische Infektion und chronische Inflammation gekennzeichnet. Grundlage der fortschreitenden Zerstörung der Lunge und der progredienten Verschlechterung der Lungenfunktion ist ein von neutrophilen Granulozyten dominierter, gewebsschädigender Entzündungsprozess. Insbesondere die chronische Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* und dessen mukoide Transformation führen zu einer hochgradig ineffektiven, perpetuierten Entzündungsreaktion. Die akute pulmonale Exazerbation bei Patienten mit CF und chronischer Pseudomonasinfektion stellt dabei eine akute Entgleisung der lokalen infektiösen und inflammatorischen Prozesse in Verbindung mit systemischen Zeichen der Entzündungsreaktion dar. Die pulmonale Exazerbation wird gewöhnlich durch eine intravenöse Pseudomonas-wirksame Antibiotikatherapie behandelt.

Humanes neutrophiles Lipocalin (HNL) wurde in den letzten Jahren als Bestandteil der spezifischen Granula neutrophiler Granulozyten beschrieben. Als Teil der nicht-adaptiven Immunabwehr ist seine Aufgabe die Bindung bakterieller Siderophoren mit dem Ergebnis einer bakteriellen Eisenverarmung. HNL wird bei Aktivierung der neutrophilen Zelle in die Umgebung freigesetzt und kann in unterschiedlichen Körperflüssigkeiten gemessen werden. Es gilt dabei als hochspezifischer Marker neutrophiler Entzündungsaktivität. HNL wird insbesondere als sensitiver und spezifischer Marker für die Diagnose der akuten pulmonalen Exazerbation bei CF angesehen.

**ZIELSETZUNG:** Bei der pulmonalen Exazerbation von CF-Patienten mit chronischer Pseudomonasinfektion sollte die Veränderung neutrophiler Inflammationsmarker in Serum und Sputum unter intravenöser Pseudomonas-wirksamer Antibiotikatherapie

studiert werden. Ziel war eine Aussage zur Eignung von HNL als Aktivitätsparameter bei CF und ein Vergleich von HNL mit weiteren Inflammationsmarkern.

**METHODEN:** Es wurden Serum- und Sputumproben bei 19 Fällen einer pulmonalen Exazerbation und 10 Patienten im stabilen Intervall einer CF-Erkrankung untersucht. Eine Exazerbation war durch klinische Zeichen und zusätzliche Befunde aus Lungenfunktion und Thorax-Röntgenbild definiert. Die Konzentration von HNL wurde in Serum und Sputum jeweils vor, während und am Ende einer i.v.-Therapie gemessen und wurde mit den Werten für Serum- und Sputum-Myeloperoxidase (MPO), C reaktivem Protein im Serum (CRP), absoluter Neutrophilenzahl im Blut sowie mit Lungenfunktionsparametern verglichen.

**ERGEBNISSE:** Die Werte von HNL im Serum waren gut mit den Konzentrationen im Sputumüberstand korreliert ( $r = 0.625$ ,  $p < 0.001$ ). In den Fällen mit pulmonaler Exazerbation waren die HNL-Werte signifikant höher als bei den stabilen Patienten im Intervall (Median 203  $\mu\text{g/l}$  vs. 91  $\mu\text{g/l}$  im Serum,  $p = 0.007$ , und 36  $\text{mg/l}$  vs. 11  $\text{mg/l}$  im Sputum,  $p = 0.03$ ). Die intravenöse antibiotische Behandlung führte zu einem Abfall der Serum-HNL-Werte (Median 203  $\mu\text{g/l}$  vor, gegenüber 107.5  $\mu\text{g/l}$  nach Therapie,  $p < 0.001$ ) und zu einem vergleichbaren Rückgang der MPO im Serum (Median 810  $\mu\text{g/l}$  vor, im Vergleich zu 594  $\mu\text{g/l}$  nach Antibiotika,  $p = 0.005$ ). Das Serum-HNL zeigte ein frühes Ansprechen in den ersten Tagen der Therapie. Dies konnte für die Serum-MPO nicht beobachtet werden. Die antibiotische Behandlung war jedoch nicht mit einer signifikanten Abnahme von HNL und MPO im Sputumüberstand verbunden ( $p = 0.185$  für HNL und 0.717 für MPO).

**SCHLUSSFOLGERUNG:** HNL als Bestandteil neutrophiler Granula ist ein zusätzlicher Marker für den neutrophil dominierten Entzündungsprozess bei der Lungenerkrankung der cystischen Fibrose. Die Bestimmung von HNL im Serum erleichtert laborchemisch die Diagnose einer akuten pulmonalen Exazerbation und ergänzt die Beurteilung des Therapieerfolgs bei Pseudomonas-wirksamer Antibiotikabehandlung. HNL scheint anderen Inflamationsmarkern teilweise überlegen zu sein. Serumspiegel stellen aber lediglich einen Surrogatparameter für die pulmonale Inflammation dar. Die Werte im Sputum repräsentieren die chronische bronchiale Inflammation. Das Verhalten der Sputumwerte deutet dabei auf einen auch nach antibiotischer Behandlung fortbestehenden neutrophilen Entzündungsprozess hin.

**ABSTRACT:** Human neutrophil lipocalin (HNL), a highly specific marker for neutrophil activity, was evaluated as a diagnostic and monitoring tool of acute pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. We assessed serum and sputum samples in 19 cases of exacerbation and 10 patients who were in a stable condition. Pulmonary exacerbation was defined by clinical symptoms and additional results of pulmonary function testing or a chest X-ray. The concentration of HNL in serum and sputum was measured before, during and at the end of intravenous antibiotic treatment, and was compared to Myeloperoxidase (MPO), C reactive protein (CRP), neutrophil cell count and pulmonary function. The levels of HNL in serum showed marked correlation to values in sputum ( $r = 0.625$ ,  $p < 0.001$ ). HNL was significantly higher in cases of exacerbation in comparison to stable patients (median 203  $\mu\text{g/l}$  vs. 91  $\mu\text{g/l}$  in serum,  $p = 0.007$ , and 36  $\text{mg/l}$  vs. 11  $\text{mg/l}$  in sputum,  $p = 0.03$ ). Antibiotic treatment led to a highly significant decrease in serum HNL (median 203  $\mu\text{g/l}$  before in comparison to 107.5  $\mu\text{g/l}$  after therapy,  $p < 0.001$ ) and a comparable decline of MPO in serum (median 810  $\mu\text{g/l}$  before in comparison to 594  $\mu\text{g/l}$  after antibiotics,  $p = 0.005$ ). Serum HNL evidenced an early response during the first days of treatment. This was not observed for serum MPO. Antibiotic treatment did not result in a significant reduction of HNL and MPO in sputum ( $p = 0.185$  for HNL and 0.717 for MPO). HNL, a unique component of the

neutrophil, is a specific marker for the neutrophil-dominated inflammatory process in cystic fibrosis lung disease. Measured in serum, HNL gives notice of an acute pulmonary exacerbation, and appears therefore useful for monitoring the therapeutic response during intravenous antibiotic treatment. Serum levels however, are only a surrogate parameter for pulmonary inflammation, sputum values representing more the pulmonary compartment suggest a persistent neutrophil activation in the airways even after antibiotic therapy.

## 6.Literaturverzeichnis

1. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989;245:1073-1080
2. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989;245:1066-1073
3. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989;245:1059-1065
4. Gadsby DC, Nairn AC. Regulation of CFTR channel gating. *Trends Biochem Sci* 1994;19:513-518
5. Greger R, Mall M, Bleich M, Ecke D, Warth R, Riedemann N, Kunzelmann K. Regulation of epithelial ion channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Mol Med* 1996;74:527-534
6. Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Gimenez J, Reis A, Varon-Mateeva R, Macek M Jr, Kalaydjieva L, Angelicheva D, Dancheva R, Romeo G, Russo MP, Garnerone S, Restagno R, Ferrari M, Magnani C, Claustres M, Desgeorges M, Schwartz M, Schwarz M, Dallapiccola B, Novelli G, Ferec C, De Arce M, Nemeti M, Kere J, Anvret M, Dahl N, Kadasi L. The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet* 1994;7:169-175

7. Liechti-Gallati S, Schneider V, Neeser D, Kraemer R. Two buffer PAGE system-based SSCP/HD analysis: a general protocol for rapid and sensitive mutation screening in cystic fibrosis and any other human genetic disease. *Eur J Hum Genet* 1999;7:590-598
8. Davis PB, Drumm M, Konstan MW Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1229-1256
9. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1075-1082
10. Armstrong DS, Grimwood K, Carlin JB, Carzino R, Gutierrez JP, Hull J, Olinsky A, Phelan EM, Robertson CF, Phelan PD. Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1197-1204
11. Sturgess J, Imrie J. Quantitative evaluation of the development of tracheal submucosal glands in infants with cystic fibrosis and control infants. *Am J Pathol.* 1982;106:303-311
12. Chmiel JF, Davis PB. State of the Art: Why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir Res* 2003;4:8
13. Kunzelmann K, Schreiber R, Nitschke R, Mall M. Control of epithelial Na<sup>+</sup> conductance by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pflugers Arch* 2000;440:193-201
14. Jayaraman S, Joo NS, Reitz B, Wine JJ, Verkman AS. Submucosal gland secretions in airways from cystic fibrosis patients have normal [Na(+)] and pH but elevated viscosity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:8119-8123

15. Zahm JM, Baconnais S, Davidson DJ, Webb S, Dorin J, Bonnet N, Balossier G, Puchelle E. X-ray microanalysis of airway surface liquid collected in cystic fibrosis mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L309-L313
16. Jayaraman S, Song Y, Vetrivel L, Shankar L, Verkman AS. Noninvasive *in vivo* fluorescence measurement of airway-surface liquid depth, salt concentration, and pH. *J Clin Invest* 2001;107:317-324
17. Matsui H, Davis CW, Tarran R, Boucher RC. Osmotic water permeabilities of cultured, well-differentiated normal and cystic fibrosis airway epithelia. *J Clin Invest* 2000;105:1419-1427
18. Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 1998;95:1005-1015
19. Tarran R, Loewen ME, Paradiso AM, Olsen JC, Gray MA, Argent BE, Boucher RC, Gabriel SE. Regulation of Murine Airway Surface Liquid Volume by CFTR and Ca(2+)-activated Cl(-) Conductances. *J Gen Physiol* 2002;120:407-418
20. Pilewski, JM & Frizzell, RA: Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev* 1999, 79(1 Suppl):S215-S255
21. Schmidt HH, Walter U. NO at work. *Cell* 1994;78:919-925
22. Grasemann H, Michler E, Wallot M, Ratjen F. Decreased concentration of exhaled nitric oxide (NO) in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1997;24:173-177

23. Kelley TJ, Drumm ML. Inducible nitric oxide synthase expression is reduced in cystic fibrosis murine and human airway epithelial cells. *J Clin Invest* 1998;102:1200-1207
24. Saiman L, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J Clin Invest* 1993;92:1875-1880
25. Saiman L, Cacalano G, Gruenert D, Prince A. Comparison of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial cells from cystic fibrosis patients and healthy subjects. *Infect Immun* 1992;60:2808-2814
26. DiMango E, Ratner AJ, Bryan R, Tabibi S, Prince A. Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 1998;101:2598-2605
27. DiMango E, Zar HJ, Bryan R, Prince A. Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J Clin Invest* 1995(5):2204-2210
28. Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000;288:1251-1254
29. Pier GB, Coleman F, Grout M, Franklin M, Ohman DE. Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infect Immun* 2001;69:1895-1901
30. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167-193



31. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998;280:295-298
32. Tosi MF, Zakem H, Berger M. Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized pseudomonas as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch. *J Clin Invest* 1990;86:300-308
33. Shak S, Capon DJ, Hellmiss R, Marsters SA, Baker CL. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:9188-9192
34. Balough K, McCubbin M, Weinberger M, Smits W, Ahrens R, Fick R. The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1995;20:63-70
35. Cantin A. Cystic fibrosis lung inflammation: early, sustained, and severe. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:939-941
36. Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H, Berger M. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:2111-2118
37. Muhlebach MS, Stewart PW, Leigh MW, Noah TL. Quantitation of inflammatory responses to bacteria in young cystic fibrosis and control patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:186-191
38. Bonfield TL, Konstan MW, Burfeind P, Panuska JR, Hilliard JB, Berger M. Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine

interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:257-261

39. Nakamura H, Yoshimura K, McElvaney NG, Crystal RG. Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J Clin Invest* 1992;89:1478-1484

40. Kronborg G. Lipopolysaccharide (LPS), LPS-immune complexes and cytokines as inducers of pulmonary inflammation in patients with cystic fibrosis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *APMIS Suppl* 1995;50:1-30

41. Hannah S, Mecklenburgh K, Rahman I, Bellingan GJ, Greening A, Haslett C, Chilvers ER. Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro. *FEBS Lett* 1995;372:233-237

42. Burke V, Robinson JO, Richardson CJ, Bundell CS. Longitudinal studies of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Pathology* 1991;23:145-148

43. Demko CA, Byard PJ, Davis PB. Gender differences in cystic fibrosis: *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Clin Epidemiol* 1995;48:1041-1049

44. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-376

45. Brown RK, Kelly FJ. Role of free radicals in the pathogenesis of cystic fibrosis. *Thorax* 1994;49:738-742

46. Ramsey BW, Boat TF. Outcome measures for clinical trials in cystic fibrosis. Summary of a Cystic Fibrosis Foundation consensus conference. *J Pediatr* 1994;124:177-192
47. Wood RE, Leigh MW. What is a "pulmonary exacerbation" in cystic fibrosis? *J Pediatr* 1987;111:841-842
48. Regelmann WE, Elliott GR, Warwick WJ, Clawson CC. Reduction of sputum *Pseudomonas aeruginosa* density by antibiotics improves lung function in cystic fibrosis more than do bronchodilators and chest physiotherapy alone. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:914-921
49. Frederiksen B, Lanng S, Koch C, Høiby N. Improved survival in the Danish center-treated cystic fibrosis patients: results of aggressive treatment. *Pediatr Pulmonol* 1996;21:153-158
50. Rosenfeld M, Emerson J, Williams-Warren J, Pepe M, Smith A, Montgomery AB, Ramsey B. Defining a pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2001;139:359-365
51. Venge P. The monitoring of inflammation by specific cellular markers. *Scand J Clin Lab Invest* 1994;54(Suppl 219):47-54
52. Asadullah K, Döcke WD, Reinke P, Sterry W, Volk HD. Zytokinbestimmungen. *Dtsch med Wschr* 1997;122:1424-1431
53. Allen RA, Erickson RW, Jesaitis AJ. Identification of a human neutrophil protein of Mr 24 000 that binds N-formyl peptides: co-sedimentation with specific granules. *Biochim Biophys Acta* 1989;991:123-133

54. Xu SY, Carlson M, Engström Å, Garcia R, Peterson CGB, Venge P. Purification and characterization of a human neutrophil lipocalin (HNL) from the secondary granules of human neutrophils. *Scand J Clin Lab Invest* 1994;54:365–376
55. Triebel S, Blaser J, Reinke H, Tschesche H. A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS Lett* 1992;314:386-388
56. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 1993;268:10425-10432
57. Xu S, Venge P. Lipocalins as biochemical markers of disease. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1482:298–307
58. Kjeldsen L. Gelatinase granules in human neutrophils. *Eur J Haematol* 1995;54(suppl 56):9–30
59. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell*. 2002;10:1033–1043
60. Sevéus L, Amin K, Peterson CG, Roomans GM, Venge P. Human neutrophil lipocalin is a specific granule constituent of the neutrophil granulocyte. Studies in bronchial and lung parenchymal tissue and peripheral blood cells. *Histochem Cell Biol* 1997;107:423-432
61. Metso T, Venge P, Haahtela T, Peterson CG, Seveus L. Cell specific markers for eosinophils and neutrophils in sputum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with respiratory conditions and healthy subjects. *Thorax* 2002;57:449-451

62. Cowland JB, Borregard N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics* 1997;45:17-23
63. Xu SY, Petersson CG, Carlson M, Venge P. The development of an assay for human neutrophil lipocalin (HNL)--to be used as a specific marker of neutrophil activity in vivo and vitro. *J Immunol Methods* 1994;171:245-252
64. Bläser J, Triebel S, Tschesche H. A sandwich enzyme immunoassay for the determination of neutrophil lipocalin in body fluids. *Clin Chim Acta* 1995;235:137-145
65. Kjeldsen L, Koch C, Arnljots K, Borregard N. Characterization of two ELISAs for NGAL, a newly described lipocalin in human neutrophils. *J Immunol Methods* 1996;198:155-164
66. Xu SY, Pauksen K, Venge P. Serum measurements of human neutrophil lipocalin (HNL) discriminate between acute bacterial and viral infections. *Scand J Clin Lab Invest* 1995;55:125-131
67. Eichler I, Nilsson M, Rath R, Enander I, Venge P, Koller DY. Human neutrophil lipocalin, a highly specific marker for acute exacerbation in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1999;14:1145-1149
68. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilising pilocarpin iontophoresis. *Pediatrics* 1959;23:545-549
69. American Thoracic Society. Standardization of spirometry, 1994 Update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1107-1136

70. Zapletal A, Samanek M, Paul T. 1987. Lung function in children and adolescents. Methods, reference values. Basel: Karger.
71. Shwachman H, Kulczycki L. Long-term study of 105 patients with cystic fibrosis. *Am J Dis Child* 1958;96:6-15
72. Koller DY, Götz M, Eichler I, Urbanek R. Eosinophilic activation in cystic fibrosis. *Thorax* 1994;49:496-499
73. Olofsson T, Olsson I, Venge P, Elgefors B. Serum myeloperoxidase and lactoferrin in neutropenia. *Scand J Haematol.* 1977;18:73-80
74. Rayner RJ, Wiseman MS, Cordon SM, Norman D, Hiller EJ, Shale DJ. Inflammatory markers in cystic fibrosis. *Respir Med* 1991;85:139-145
75. Glass S, Hayward C, Govan JR. Serum C-reactive protein in assessment of pulmonary exacerbations and antimicrobial therapy in cystic fibrosis. *J Pediatr.* 1988;113:76-79
76. Watkin SL, Elborn JS, Cordon SM, Hiller EJ, Shale DJ. C-reactive protein is not a useful indicator of intermittent bacterial colonization in early lung disease of patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1994;17:6-10.
77. Nixon LS, Yung B, Bell SC, Elborn JS, Shale DJ. Circulating immunoreactive interleukin-6 in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1764-1769.
78. Aris RM, Stephens AR, Ontjes DA, Denene Blackwood A, Lark RK, Hensler MB, Neuringer IP, Lester GE. Adverse alterations in bone metabolism are associated with lung infection in adults with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1674-1678.

79. Valletta EA, Rigo A, Bonazzi L, Zanolla L, Mastella G. Modification of some markers of inflammation during treatment for acute respiratory exacerbation in cystic fibrosis. *Acta Paediatr* 1992;81:227-230
80. Pribble CG, Black PG, Bosso JA, Turner RB. Clinical manifestations of exacerbations of cystic fibrosis associated with nonbacterial infections. *J Pediatr* 1990;117:200-204
81. Wright PF, Khaw KT, Oxman MN, Shwachman H. Evaluation of the safety of amantadine-HCl and the role of respiratory viral infections in children with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1976;134:144-149
82. Petersen NT, Hoiby N, Mordhorst CH, Lind K, Flensburg EW, Bruun B. Respiratory infections in cystic fibrosis patients caused by virus, chlamydia and mycoplasma--possible synergism with *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Paediatr Scand* 1981;70:623-628
83. Koller DY, Götz M, Wojnarowski C, Eichler I. Relationship between disease severity and inflammation markers in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1996;75:498-501
84. Kim J, Hackley GH, Okamoto K, Rubin BK. Sputum processing for evaluation of inflammatory mediators. *Pediatr Pulmonol* 2001;32:152-158
85. Ordonez CL, Henig NR, Mayer-Hamblett N, Accurso FJ, Burns JL, Chmiel JF, Daines CL, Gibson RL, McNamara S, Retsch-Bogart GZ, Zeitlin PL, Aitken ML. Inflammatory and microbiologic markers in induced sputum after intravenous antibiotics in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:1471-1475.

86. Meyer KC, Lewandowski JR, Zimmerman JJ, Nunley D, Calhoun WJ, Dopico GA. 1991. Human neutrophil elastase and elastase- $\alpha_1$ -antiproteinase complex in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:580-585
87. Cunningham S, McColm JR, Mallinson A, Boyd I, Marshall TG. Duration of effect of intravenous antibiotics on spirometry and sputum cytokines in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2003;36:43-48
88. Niggemann B, Stiller T, Magdorf K, Wahn U. Myeloperoxidase and eosinophil cationic protein in serum and sputum during antibiotic treatment in cystic fibrosis patients with *P. aeruginosa* infection. *Mediators Inflammation* 1995;4:282-288
89. Bonfield TL, Konstan MW, Berger M. Altered respiratory epithelial cell cytokine production in cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:72-78



## 7. Abkürzungsverzeichnis

CF	cystische Fibrose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
ORCC	outwardly rectifying chloride channel
ENaC	epithelial sodium channel
NO	Stickstoffmonoxid
NF- $\kappa$ B	nukleärer Transkriptionsfaktor $\kappa$ B
IL	Interleukin
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
ECP	eosinophiles kationisches Protein
HNL	humanes neutrophiles Lipocalin
MPO	Myeloperoxidase
FEV1	Einsekundenvolumen
MEF50	maximaler expiratorischer Atemfluss bei 50 % der Atemphase
FVC	forcierte Vitalkapazität
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit

## 8.Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. D. Koller (Wien) für die Überlassung des Themas und für die Koordination der kooperativen Studie der Fachkliniken Wangen und der Universitätskinderklinik Wien. Damit verbunden ist der Dank an die Mitarbeiter der Universitätskinderklinik Wien, die an der Gewinnung von Material und Daten beteiligt waren.

Mein herzlicher Dank gilt besonders Herrn Prof. R. Urbanek (Wien), Herrn Dr. J. Otto (Wangen) und Herrn Dr. M. Rank (Wangen) für ihre freundliche, engagierte und stets ermutigende Betreuung.

Für die Unterstützung bei der Beschaffung der erforderlichen Geräte und Materialien, sowie bei der praktischen Umsetzung der Untersuchungen danke ich meinem früheren Arbeitgeber, den Fachkliniken Wangen, insbesondere Herrn A. Baumann und allen Mitarbeitern, die durch ihre Arbeit an und mit unseren Patienten die Erhebung der Daten möglich machten.

Für die Analyse der Proben sei insbesondere Herrn Prof. P. Venge (Uppsala) und seinem Team, sowie Frau Höller und ihren Mitarbeitern (Wien) herzlich gedankt.

Ganz herzlich danken möchte ich vor allem auch Herrn Prof. H. Lindemann und Herrn PD Dr. A. Artlich, die mich beim Abschluss dieser Arbeit und der Einreichung als Dissertation mit großem Einsatz unterstützten.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meiner lieben Frau Roswitha und unserer Tochter Anna, welche durch ihre Geduld und Liebe ermöglichten, dass diese Arbeit neben der täglichen Beschäftigung als Arzt entstehen konnte und welche dabei manche Stunde auf ihr Familienoberhaupt verzichten mussten.

## 9. Lebenslauf

Matthias Röschard

Geburtsdatum, –ort	10.6.1965 in Villingen
Familie	verheiratet seit 2001 mit Roswitha Röschard, geb. Weber, Erzieherin; eine Tochter, Anna Röschard, geb. 28.11.2002
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	katholisch
Eltern, Geschwister	Anita Röschard, verstorben 1997, ehemalige Kindergärtnerin; Ludwig Röschard, verstorben 1999, ehemals Internatsbetreuer; ein älterer, zwei jüngere Brüder

### SCHULBILDUNG UND ZIVILDIENTST

1975 – 1984	Gymnasium in Villingen
1984 – 1987	Zivildienst und hauptamtliche Beschäftigung beim Deutschen Roten Kreuz in Rottweil, Tätigkeit im Rettungsdienst, Anerkennung als Rettungsassistent

### BERUFSAUSBILDUNG

1987 – 1994	Medizinstudium an der Freien Universität Berlin
1989 – 1992	Tutor am Institut für Anatomie der FU Berlin
9.7.1996	Approbation als Arzt
10.12.2002	Anerkennung zum Facharzt für Kinder- und Jugendmedizin

**ÄRZTLICHE TÄTIGKEIT**

1995 – 1996	Arzt im Praktikum in der Kinder-Reha-Klinik Bad Kösen; Schwerpunkt chronische Atemwegserkrankungen
1996 – 1997	Assistenzarzt in der Universitätskinderklinik Ulm; Allgemeinpädiatrie und Hämatologie
1997 – 2000	Assistenzarzt in der Kinderklinik der Fachkliniken Wangen; Weiterbildung in pädiatrischer Pneumologie und Allergologie
2000 – 2003	Assistenzarzt in der Kinderklinik in Bamberg; Tätigkeit in der Neonatologie und Intensivmedizin
seit Januar 2004	Facharzt in der Kinderklinik St. Nikolaus in Ravensburg, Weiterbildung im Schwerpunkt Neonatologie

**DISSERTATION**

1998	Beginn einer kooperativen Studie zu Neutrophilenmarkern bei CF, Fachkliniken Wangen und Universitäts- Kinderklinik Wien
1999 – 2000	Sammlung des Untersuchungsmaterials
2000 – 2003	Auswertung der Proben in Wien und Uppsala
2003 – 2005	statistische Aufarbeitung und Verfassung der Dissertationsschrift

Ravensburg, im Februar 2005